

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

107089233

EP 00 / 0 9 4 6 8

EPO - DG 1

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

09. 01. 2001

REC'D 17. JAN 2001 (42)	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

EJU

05/04  
# 478**Aktenzeichen:**

100 14 234.6

**Anmeldetag:**

22. März 2000

**Anmelder/Inhaber:**

EVOTEC BioSystems AG, Hamburg/DE

**Bezeichnung:**Quantitative Analyse und Typisierung subzellulärer  
Partikel mittels SIFT**IPC:**

G 01 N 33/50

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 11. Oktober 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

## Quantitative Analyse und Typisierung subzellulärer Partikel mittels SIFT

### 1. Prionkrankheiten

Der Einsatzbereich des vorliegenden Verfahrens ist die Diagnostik von Prionkrankheiten und Typisierung verschiedener Erregerstämme. Die Prionkrankheiten oder transmissiblen spongiformen Enzephalopathien stellen eine Gruppe übertragbarer neurodegenerativer Krankheiten bei Mensch und Tier dar, zu der die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen sowie Scrapie beim Schaf und BSE beim Rind gehören. Prionerkrankungen sind charakterisiert durch die Ablagerung einer aggregierten, pathologischen Form des Prionproteins (PrP) im Gehirngewebe betroffener Individuen, die als PrP<sup>Sc</sup> bezeichnet wird. Grundsätzlich sind Prionerkrankungen übertragbar, das übertragbare Agens wird als "Prion" bezeichnet. Es wird angenommen, dass PrP<sup>Sc</sup> der entscheidende, wenn nicht sogar der einzige Bestandteil des Prions ist. Eine erregerassoziierte Nukleinsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Das krankheits- und infektiösitätsassoziierte PrP<sup>Sc</sup> unterscheidet sich von der physiologisch im Organismus vorkommenden Form des Prionproteins (PrP<sup>C</sup>) durch seine Konformation, insbesondere seinen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur, seine relative Resistenz gegenüber Protease K und seine Neigung zur Bildung großer multimerer Aggregate. Es wird im Rahmen der sogenannten Prionhypothese angenommen, dass die PrP<sup>Sc</sup>-Form mit der PrP<sup>C</sup>-Form in Wechselwirkung treten und dabei das körpereigene PrP<sup>C</sup> über eine Konformationsänderung in die PrP<sup>Sc</sup>-Form umwandeln kann. Das so neu entstandene PrP<sup>Sc</sup> kann dann seinerseits mit weiteren PrP<sup>Sc</sup> Molekülen in Wechselwirkung treten und diese ebenfalls in PrP<sup>Sc</sup> umwandeln, so dass sich in einer lawinenartigen Kettenreaktion aus dem körpereigenen PrP<sup>Sc</sup> große Mengen PrP<sup>Sc</sup> bilden.

Ein wichtiges Phänomen bei den Prionkrankheiten ist das Auftreten verschiedener Erregerstämme. Erregerstämme unterscheiden sich auch bei Passage in Wirten mit identischem Prionprotein, z.B. in Maus-Inzuchtstämmen, konstant in verschiedenen Eigenschaften wie Inkubationszeit, klinischen Symptomen, Läsionsmuster im Gehirn und Übertragbarkeit auf andere Spezies. Im Rahmen der Prionhypothese bedeutet das Auftreten verschiedener

Erregerstämme in Tieren mit gleicher PrP-Aminosäuresequenz, dass verschiedene stabile Formen von PrP<sup>Sc</sup> existieren müssen, die jeweils PrP<sup>C</sup> in die entsprechende pathologische Form umwandeln können. Auch bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen finden sich verschiedene distinkte Unterformen, die sich molekular anhand eines Polymorphismus am Codon 129 des Prionproteingens (*PRNP*) und der Größe des Proteinase K-resistenten Fragmentes des Prionproteins im Westernblot unterscheiden lassen, und mit unterschiedlichen phänotypischen Krankheitsausprägungen assoziiert sind.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das einzelne pathologische Prionproteinaggregate in einem homogenen Assay ultrasensitiv detektierbar macht und die detektierten Aggregate zu charakterisieren und zu typisieren.

## 2. SIFT ("Scanning for Intensely Fluorescent Targets")

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren vorgeschlagen zur Charakterisierung pathologischer Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch geeignet, zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln mittels zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe, wobei

- die Partikel einzelne Moleküle oder Molekülaggregate sind mit einer Vielzahl von Bindungsstellen für mindesten eine der mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden,
- die mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden in der Probe anwesend sind,
- ein Maß für die Anzahl der gebundenen Sonden und
- das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln ermittelt wird

- und wobei die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt.

Eine vorteilhafte Möglichkeit der Charakterisierung pathologischer Prionproteinaggregate (im folgenden "Zielmoleküle" genannt) ist deren Markierung mit geeigneten fluoreszenzmarkierten Sondenmolekülen und die anschließende getrennte Detektion und Analyse einzelner Aggregate. Hierfür dient aufbauend auf einem gerätetechnischen Aufbau zur Zweifarben-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, ein Meßverfahren, das im folgenden als SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) bezeichnet wird. SIFT beruht auf einer zeitaufgelösten Intensitätsanalyse eines Fluoreszenzsignals aus einem offenen Volumenelement, das durch eine konfokale Abbildung eines oder mehrerer in einem Fokus gebündelter Anregungs-LASER definiert wird. Dieses Verfahren unterscheidet sich vom Stand der Technik zur FCS-basierten Amyloid-Aggregat-Detektion (Pitschke et al. 1998) durch folgende Modifikationen:

- a) Quantifizierung des Zielmolekül-bedingten Signalanteils durch Analyse der Intensitäts-Verteilung der gemessenen Fluoreszenz in sukzessive aufgezeichneten Kanälen konstanter Länge (im Mikro- bis Millisekundenbereich), wodurch das sehr intensive Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle vom Hintergrundsignal freier Sondenmoleküle abgetrennt werden kann. Alternativ könnte die intensitätsbasierte Abtrennung des Zielmolekül bedingten Signalanteils auch über einen Algorithmus zur Peakdetektion und -analyse erfolgen.
- b) Scannen der Probe durch Erzeugen einer konstanten Relativbewegung zwischen Probe und Fokus Dieses Ziel ist in dem erfindungsgemäßen Messaufbau durch ein mäanderförmiges Bewegen der in eine Messkapillare eingefüllten Probe realisiert. In einer weiteren Ausführungsform kann dieser Aspekt auch durch eine Optik, die eine Bewegung des Fokus gestattet oder durch eine Flusskapillare realisiert werden. Das Scannen bewirkt zwei Vorteile:
  1. Das untersuchte Volumen und damit die Messsensitivität wird erheblich erhöht.
  2. Für große, sehr langsam diffundierende Zielmoleküle wird die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus nicht mehr durch die Diffusionszeit  $T_{\text{Diffs}}$ , sondern durch die



Scangeschwindigkeit bestimmt. Dies ist vorteilhaft, weil im wesentlichen alle Zielmoleküle auf etwa die gleiche Zahl Messkanäle abgebildet werden. Dadurch wird die Anzahl der sehr intensiven Kanäle ein direktes Maß für die Zahl und Konzentration stark markierter Zielmoleküle.

- c) Verwendung von Antikörpern als Sondenmoleküle. Diese haben im Vergleich zu monomeren Aggregat-Bausteinen den Vorteil, einer geringen Selbstaggregation. Dieser Punkt wird erfindungsgemäß zwar bevorzugt, das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich aber prinzipiell mit jeder spezifisch an das Zielmolekül bindenden fluoreszenzmarkierten Sonde durchführen.
- d) Simultane Analyse zweier oder mehrerer getrennt im selben Volumenelement messbarer, in verschiedenen Wellenlängenbereichen fluoreszierender Sonden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß ermittelten Daten aus Mehrfach-, insbesondere Zweifarbmessungen in einer entsprechend mehrdimensionalen, insbesondere zweidimensionalen Array angeordnet und z.B. als Intensitätshistogramm dargestellt. Dabei ist die Zahl von Kanälen mit gleichzeitig hohen Werten für die mehreren oder beiden Farben ein Maß für die Zahl und Konzentration spezifisch mit am mehreren, insbesondere zwei unabhängigen Sonden markierter Zielmoleküle ist. Wie schon unter Punkt a) erwähnt, ist hier alternativ eine mehrfarbige Peakanalyse möglich.

### **3. Quantitative Analyse und Typisierung von pathologischen Prionproteinaggregaten mittels SIFT**

Neben der erhöhten Spezifität in der Detektion von Zielmolekülen hat die erfindungsgemäße Methode (zwei- oder mehrfarbiges SIFT, (vgl. 2.)) ein zusätzliches, weitergehendes Potential: Für im wesentlichen jedes detektierte Zielmolekül kann separat die relative Markierungsintensität der verschiedenfarbigen Sonden gemessen werden. Im Gegensatz zur absoluten Intensität der Einzelfarben ist dieses Markierungsverhältnis bei nahezu deckungsgleichen Volumenelementen für die verschiedenen separat detektierten Farben weitgehend unabhängig von der Route, die das jeweilige Zielmolekül durch das Detektionsvolumen nimmt. Bei einer homogenen Population an Zielmolekülen ist daher das Mar-

kierungsverhältnis für alle detektierten Partikel ähnlich, in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm streut daher das Zielmolekül spezifische Signale um eine Gerade, deren Steilheit von der relativen Bindung der zwei analysierten Sondenmoleküle bestimmt wird. Bei der Analyse eines anderen Typs von Zielmolekül mit abweichenden Bindungseigenschaften ergibt sich entsprechend ein anderes Markierungsverhältnis (Figur 1). Die relative Bindung zweier verschiedener Sonden kann somit leicht und schnell in einem homogenen Assay unter definierten Pufferbedingungen ermittelt werden und liefert unter geeigneten Bedingungen einen jeweils charakteristischen Wert für verschiedene Zielmolekültypen.

Im Fall der Prionkrankheiten ist aufgrund des Vorkommens verschiedener, in ihrem biologischen Verhalten unterscheidbarer Erregerstämme (vgl. 1.) auch in Wirten mit identischer PrP-Primärstruktur davon auszugehen, dass verschiedene pathologische Formen von PrP<sup>Sc</sup> existieren, die sich offenbar nur in ihrer Konformation oder Aggregatstruktur unterscheiden. Durch konformationsabhängig unterschiedliche Antikörperbindung sollten diese verschiedenen Formen oder Prion-Stämme bei Verfügbarkeit geeigneter monoklonaler Antikörper grundsätzlich unterscheidbar sein. So findet sich bei der Untersuchung von gereinigten PrP<sup>Sc</sup>-Aggregaten von Creutzfeldt-Jakob-Patienten in Abhängigkeit davon, ob es sich um pathologisches Prionprotein vom Typ 1 oder Typ 2 handelt, ein unterschiedliches Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper 12F10 und Pri917. Sowohl beim Menschen als auch im Tierreich ist die Erregerstamm-Typisierung von großer epidemiologischer Bedeutung, hierbei ist von besonderer Relevanz die Identifizierung des BSE-Erregerstammes nach Übertragung auf andere Spezies. Insbesondere beim Menschen dürfte darüber hinaus eine Erregerotypisierung auch prognostisch und eventuell therapeutisch bedeutsam sein.

Die Typisierung über relative Bindung verschiedener Sondenmoleküle mittels SIFT hat dabei mehrere konzeptionelle Vorteile:

- 1) Da jedes Zielmolekül separat analysiert wird, können grundsätzlich auch Mischungen verschiedener Zielmoleküle untersucht und das Mengenverhältnis der Komponenten bestimmt werden.

- 2) Zur Typisierung genügen Sonden mit einer mäßig unterschiedlichen Affinität zu den verschiedenen Zielmolekültypen, eine Alles-oder-Nichts-Bindung ist nicht erforderlich.
- 3) Aus der Zugänglichkeit verschiedener, von unterschiedlichen Sondenmolekülen erkannter Epitope bei unterschiedlichen Typen/Erregerstämmen können Rückschlüsse auf die räumliche Struktur gezogen werden.
- 4) Es genügen geringe Mengen wenig konzentrierten Zielmoleküls, eine vorhergehende Reinigung ist nicht nötig, wodurch das Zielmolekül auch unter nahezu nativen physiologischen Bedingungen analysiert werden kann.
- 5) Gegenüber etablierten Verfahren zur PrP<sup>Sc</sup> Typisierung (Westernblot) erlaubt das Verfahren einen schnellen Test in einem homogenen Assay, so dass eine große Probenzahl analysiert werden kann (diagnostisches oder Wirkstoff-Screening).

#### 4. Weitere Anwendungsbereiche

Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich nicht auf die unter Punkt 3. beschriebene konkrete Anwendung im Bereich der Typisierung verschiedener Prion-Stämme beschränkt. Grundsätzlich ist eine Analyse verschiedenster subzellulärer Partikel möglich, die sich mit fluoreszenzmarkierten Sonden markieren lassen. Die Vorteile, die unter Punkt 3. aufgeführt wurden, gelten hier analog. Insbesondere sind folgende Einsatzfelder zu nennen:

- a) Im Bereich der Prionkrankheiten ist neben der Erregerstammtypisierung die relative Bindung von PrP<sup>c</sup> verschiedener Spezies an Prionproteinaggregate einer bestimmten Spezies untersuchbar, was eine Abschätzung der jeweiligen Speziesbarriere für eine Krankheitsübertragung ermöglicht.
- b) Andere (neuro-)degenerative Krankheiten mit Bildung amyloidartiger pathologischer Aggregate wie insbesondere der Morbus Alzheimer sind analog untersuchbar. Auch hier werden Subtypen pathologischer Aggregate mit potentiell unterschiedlicher diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung erkennbar.

- c) Andere subzelluläre Partikel werden analog untersuchbar, bis hin zur phänotypischen Analyse viraler Partikel.

Figur 1 zeigt Zweifarben-Intensitätshistogramme von humanem PrPSc Typ 1 und Typ 2

PrP-Material: Menschliches PrPSc wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. Gambetti (Cleveland) zur Verfügung gestellt. Anhand dieses Materials wurden die unterschiedlichen Subtypen der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung wurden durch Parchi et al. (1997) durch konventionelle Methoden nach Straintypen (1/2) und den Polymorphismus am Codon 129 des humanen Prionproteins differenziert.

Fluoreszenzmarkierte Proben:

Als Sonden wurden monoklonale Antikörper gegen das Prionprotein mit fluoreszenzfarbstoffen markiert. PrP (AA 142-160) spezifischer Antikörper 12F10 (Krasemann 1996) (Institut für Bioanalytik, Heiligenstadt) wurde mit durch Protein G Affinitätschromatografie (AB purification Kit, Pharmacia) aus serumfreiem Zellkulturüberstand aufgereinigt und mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (AB labeling Kit, Amersham) markiert.

PrP (AA 214-230) spezifischer Antikörper pri917 wurde durch den Service de Pharmacologie et Immunologie (CEA, Saclay, France) zur Verfügung gestellt. Er wurde mit dem grünen Farbstoff Alexa488 (Molecular Probes) markiert.

Für die Messung wurde PrP-Material 1:10 in PBS + 0.1% NP-40 (Sigma) verdünnt und fluoreszenzmarkierte Sonden mit einer Endkonzentration von  $c(12F10) = 12 \text{ nM}$  und  $c(pri917) = 9 \text{ nM}$  zugegeben.

SIFT-Setup:

Die Messung erfolgte in einem Zweifarben FCS Gerät (ConfoCor Prototyp, C. Zeiss, Jena). Das konfokale Detektionsvolumen wurde durch die übereinanderliegenden Foci eines HeNe-Lasers (633nm) und eines Ar<sup>+</sup> Lasers (488nm) gebildet, die durch ein Mikroskop-

objektiv in die Messkapillare fokussiert wurden. Größe und Form des Detektionsvolumens wurden durch Autokorrelationsmessungen mit einer Rhodamin Green Farbstofflösung bestimmt. Das Messgerät war mit einem Positioniertisch ausgestattet (Märzhäuser, Wetzlar), der es erlaubte, die Probe mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s während der Messung abzufahren. Die Messung erfolgte 600s bei 22°C. Das Fluoreszenzsignal beider Kanäle wurde in einer Mehrkanal-Zählerkarte über Intervalle von 500  $\mu$ s summiert. Die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Zahl an Photonen beider Kanäle auftrat wurde in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm gespeichert.

Figur 2 zeigt die relative Verteilung des Signals der gebundenen PrP spezifischen Sonden (12F10-Cy5) und (pri917-Alexa488) für menschliches PrPSc (129 M/M) Typ 1 und PrPSc (129 M/M) Typ 2. Im Signal des MM1 PrP ist der Anteil beider Sonden annähernd gleich während das Signal der MM2 Aggregate weniger als 20% rotes (12F10) Signal enthält.

#### Quantitative Auswertung:

Um die relative Bindung der Antikörpersonden am PrP-target zu quantifizieren wurde die relativen Anteile des grünen und roten Fluoreszenzsignal am hochintensen Signal der SIFT Messung bestimmt. In einem ersten Schritt wurde das Maximum der zweidimensionalen Intensitätsverteilung bestimmt ( $I_{\max}$ ). Das Signal der freien Sonden wurde durch eine Schwelle von  $6 \cdot I_{\max}$  vom hochintensen Signal abgetrennt. Das Intensitätshistogramm wurde entsprechend dem relativen Signal der roten und der grünen Sonden in Sektoren aufgeteilt, in denen die Zahl der hochintensen Messkanäle summiert wurde.

## Materialien

Die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Chromatographiematerialien und Proteinen sind im Folgenden aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien besaßen die höchste erhältliche Reinheit. Bei Fluoreszenzfarbstoffen und Proteinen ist die Artikelnummer angegeben. Bezugsquellen von Materialien, die uns im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen zur Verfügung gestellt wurden, sind in den einzelnen Abschnitten angegeben.

Firma	Material	Artikelnr.
Calbiochem, Nottingham (UK)	NP-40 Detergent 10 %	492017
MoBiTec, Göttingen	Mikospinsäulen	
Pharmacia, Freiburg	Sephadex G 75	
	Sephadex G15	
Sigma, St. Louis, Mis (USA)	Dulbecco's PBS	D-7030
	SDS	
	Tween20	
VitroCom Inc., Mountain Lakes, NJ (USA)	Glaskapillaren (50 x 2.6 x 0.2 mm)	CI-3520
Wiederholdt & Hutter	Deutscher Wappenlack	
<b>Fluoreszenzfarbstoffe</b>		
Amersham, Arlington Heights, IL (USA)	Cy5 Labeling Kit	PA35000
Molecular Probes, Eugene, OR (USA)	Alexa Fluor 488 Labeling Kit	A-10235
	FluoSpheres (505/515)	F-8888
	Oregon Green 488 Labeling Kit	F-6154
<b>Proteine</b>		
Bachem AG	Amyloid $\beta$ -Protein (1-42)	H-1368 (Lot: 511908)
Sigma, St. Louis, MI (USA)	Proteinase K	P2308
	bovines Serum-Albumin (BSA)	A2153

### Puffer und Stammlösungen

Die folgende Liste enthält alle verwendeten Puffer und Stammlösungen, die mit demineralisiertem Wasser angesetzt worden sind, sowie ihre Abkürzungen. Pufferlösungen wurden vor Verwendung durch einen Membranfilter (0.22  $\mu$ m, Millipore) sterilisiert.

Abkürzung	Zusammensetzung		
AP	SDS		3 % (w/v)
	Tris-HCl	pH 6.8	60 mM
AS	NaCl		100mM
	KAc/HAc	pH 5.0	10 mM
B-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7.0	20 mM
E-Puffer	Glycin-HCl	pH 2.7	100 mM
N-Puffer	Tris-HCl	pH 7.0	1 M
NaPi	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7.2	10 mM
NaP2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH 8.4	0.5 M
NaC	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	pH 9.2	1 M
Lyse-Puffer	NaCl		100mM
	EDTA		10 mM
	NP-40		0.5% (v/v)
	Na-Desoxycholat		0.5 % (w/v)
	Tris-HCl	pH 7.4	10 mM
PBS	NaCl		100mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7.2	10 mM
PBSN	NaCl		100mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7.2	10 mM
	NP-40		0.1 % (w/v)
PBSS	NaCl		100mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7.2	10 mM
	SDS		0.2 % (w/v)
RIPA	NaCl		100mM
	EDTA		1 mM
	NP-40		1 % (v/v)
	Na-Desoxycholat		0.5 % (w/v)
	Tris-HCl	pH 7.4	10 mM

## Prionprotein

**rPrP** Als Modellsystem zur Untersuchung der Aggregation des Prionproteins wurde vornehmlich ein in *E. Coli* erzeugtes rekombinantes Prionprotein verwendet, das homolog zu den Aminosäuren 90-231 des Prionproteins des syrischen Hamsters war. Es entsprach damit dem proteaseresistenten Kern des pathologischen PrP<sup>Sc</sup>, war anders als das natürliche Protein jedoch nicht glykosyliert und besaß keinen Membranan-ker. Ansonsten entsprach seine Struktur den Aminosäuren 90-231 aus Abbildung 2.5. Das Protein wurde in einem STII TIR Vektor im *E. Coli* Stamm 27C7 expri-miert wie von Mehlhorn beschrieben [75]. Das Protein lag als Stammlösung einer Konzentration von 1 mg / ml in PBS + 0.2 % SDS vor.

**Prion Rods** Die Präparation des aggregierten PrP (27-30) aus syrischen Hamstern, den sogenannten *prion rods*, ist in [96] beschrieben. Das Protein lag sonifiziert in einer Konzentration von 30 µg/ml in NaPi + 0.2 % SDS (w/v) vor.

Beide Proteine wurden in der Arbeitsgruppe von S.B. Prusiner (San Francisco) hergestellt und uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe D. Riesner (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

## Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene spezifische Antikörper gegen Epitope des Prionproteins und des A $\beta$  (1-42)-Peptids verwendet. Sie sind im Folgenden aufgeführt.

Der Antikörper **Pri917** ist gegen die Aminosäuren (214-230) des menschlichen PrP gerichtet. Er wurde vom 'Service de Pharmacologie et d'Immunologie', CEA, Saclay entwickelt.

Der Antikörper **3F4** ist gegen die AS (109-112) des Hamster-PrP gerichtet und besitzt eine etwas schwächere Affinität zu humanem PrP. Er wurde in der Arbeitsgruppe H. Diringer / M. Beekes (RKI, Berlin) hergestellt [61].

Der Antikörper **15B3** erkennt spezifisch die aggregierte PrP<sup>Sc</sup> Isoform. Er wurde von der Firma Prionics (Schweiz) hergestellt. Die angegebenen Antikörper wurden uns im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes Prionkrankheiten über die Arbeitsgruppe H. Kretzschmar (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Der Antikörper **12F10**, der gegen AS (142-160) des humanen PrP gerichtet ist (Krasemann [62]). Er wurde über die Firma IBA, Heiligenstadt bezogen.

Der A $\beta$ -spezifische Antikörper **6E10**, der gegen den N-Terminus der A $\beta$ -Peptide (1-17) gerichtet ist, wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe J. Wiltfang (Göttingen) zur Verfügung gestellt.



Im Folgenden sind verwendete kommerziell erhältliche Antikörper aufgeführt:

Bezeichnung	Antigen	Artnr.	Hersteller
MAM1 (IgM)	$\beta$ -Amyloid (1-40)	T-0009	BMA
Anti-IL8 (IgG1)	humanes IL-8	A-8326	Sigma BioSciences, St. Louis, Mis (USA)
Anti-A40 (Serum)	$\beta$ -Amyloid 1-40	I-2519	Sigma BioSciences, St. Louis, Mis (USA)
pAB42 (polyklonaler AK)	$\beta$ -Amyloid 1-42	PC150	Oncogene Cambridge MA (USA)

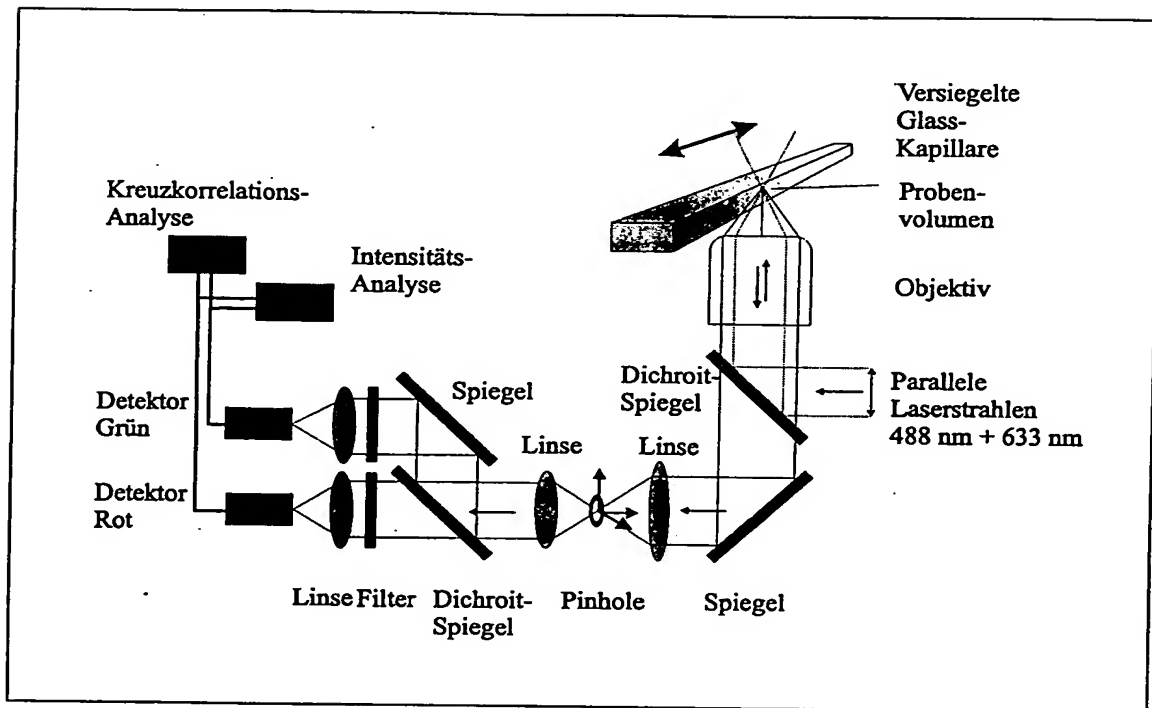
### Liquorproben

Für die diagnostische Untersuchung wurde Spinalliquor von Patienten verwendet, die im Rahmen der deutschlandweiten epidemiologischen CJD Studie (BMG-Projekt 325-4471-02/15, s. auch [133],[134]) gewonnen worden sind. Die Entnahme im Rahmen der Studie erfolgte unter Zustimmung der Patienten. Sie ist von der Ethikkommission der Universität genehmigt.

Für die CJD Diagnostik wurde Spinalliquor von 37 Patienten verwendet, die an neurodegenerativen Erkrankungen litten. Darunter befanden sich 11 neuropathologisch gesicherte Fälle, sowie 13 Fälle, deren Diagnose nach epidemiologischen Kriterien [126] als wahrscheinlich galt.

Zur Alzheimer Diagnostik wurde Spinalliquor von 6 Patienten, deren Diagnose der Alzheimer Demenz anhand biochemischer (Konzentration  $A\beta$  42 / 40 / 38), neurologischer sowie psychologischer Kriterien gesichert war, sowie von 12 Kontrollpatienten verwendet. Die Liquorproben wurden im Rahmen der neurologischen Routinediagnostik gewonnen. Die Proben der klinischen Studien sind hinsichtlich ihrer Vorbehandlung nicht standardisiert. Sie wurden nach der Abnahme bei -70°C gelagert und für biochemische Untersuchungen mehrmals aufgetaut.

Spinalliquor von 5 AD Patienten sowie 4 Kontrollpatienten, wurde in der Arbeitsgruppe M. Haupt (Universitätsklinikum Düsseldorf) eigens für die liquordiagnostische Anwendung gewonnen und nach einem proprietären Verfahren asserviert (Evotec Analytical Systems, Erkrath).



Figur 3: Schematischer Aufbau der konfokalen Zweifarben-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

## Messaufbau der FCS

Als Basis für die Aggregationsmessungen diente ein Zweifarben-Kreuzkorrelations FCS-Aufbau. Diese Technik wurde von Schwille entwickelt, theoretisches Konzept und praktischer Aufbau sind in [109] ausführlich beschrieben. Auf Grundlage dieses Aufbaus wurde von der Firma C. Zeiss (Jena) ein kommerzieller Prototyp entwickelt, an dem die Aggregationsmessungen durchgeführt wurden. Für die SIFT-Messungen wurde der Prototyp um eine Ansteuerung zum Scannen der Probe und um eine Messkarte zur Intensitätsanalyse erweitert.

Der Messaufbau ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Der Strahl eines Ar-Ionen Lasers (488 nm) und eines He-Ne Lasers (633 nm) werden über eine *single-mode* Glasfaser, eine Aufweitungsoptik und einen doppelten Dichroiten parallel in den Strahlengang eingekoppelt und durch ein Mikroskopobjektiv (x40 bzw. x63) in der Messlösung fokussiert. Die Brennpunkte beider Strahlen bilden das offene

Messvolumen der FCS. Die Apertur des Objektives wird vollständig ausgeleuchtet, so dass für den blauen Fokus ein Radius von  $0.25\ \mu\text{m}$  (x40) bzw.  $0.19\ \mu\text{m}$  (x63) resultiert. Die Abbildung der Foci ist nicht völlig ideal, der Radius des roten Brennpunktes ist um ca. 20 % größer als der des grünen Fokus, die Mittelpunkte beider Foci weichen um ca. 50 nm voneinander ab. Der grüne Fokus liegt damit jedoch noch vollständig innerhalb des roten.

Das Fluoreszenzlicht wird über das Mikroskopobjektiv gesammelt und konfokal auf einem Pinhole abgebildet. Das Pinhole kann in Durchmesser, und in x-y-z-Achsen durch Schrittmotoren gesteuert werden. Das parallelisierte Fluoreszenzlicht wird über eine Dichroit/Filterkombination in rote und grüne Emission gespalten und auf zwei Avalanche-Photodioden (APD) fokussiert. Die APD besitzen eine Detektionseffizienz von ca. 70 % und erzeugen für jedes detektierte Photon einen TTL-Puls. Das TTL-Signal wird über eine Verstärkerweiche (Eigenbau, R. Weise) gleichzeitig an eine Hardwarekorrelatorkarte (ALV-5000, ALV, Langen) zur Korrelationsanalyse und an eine Multichannel-Scaler-Timer (MCS) Karte (MCD-2, FAST GmbH, Unterhaching bzw. C. Zeiss, Jena) zur Intensitätsanalyse des Signals weitergeleitet.

Bei den Messungen kamen zwei Objektiv/Pinhole Kombinationen zum Einsatz:

- Objektiv x40 / 1.2 N.A. (Zeiss) und  $50\ \mu\text{m}$  Pinhole
- Objektiv x63 / 1.2 N.A. (Olympus) und  $30\ \mu\text{m}$  Pinhole.

Wo nicht anders angegeben betrug die Leistung der Anregungslaser  $57\ \mu\text{W}$  (488 nm) bzw.  $53\ \mu\text{W}$  (633 nm).

## Scanning

Zum Scannen der Probe wurde die Messlösung in eine Glaskapillare von 50 mm Länge, 0.18 mm Wandstärke und einem Innenquerschnitt von  $2.6 \times 0.2\ \text{mm}$  gefüllt. Das Probenvolumen betrug dabei  $20\ \mu\text{l}$ . Die Enden der Messkapillare wurde durch einen Lack auf Kollophoniumbasis auf einem Objektglaträger befestigt und dabei gleichzeitig versiegelt (s. Abb. 3.2 kleines Bild).

Das Scannen der Messlösung wurde durch Ansteuerung des Positioniertisches des FCS-Messaufbaus (Märzhäuser, Wetzlar) über eine Makrosprache (WinBatch, Wilson Window Ware, Seattle WA, USA) realisiert. Innerhalb des Confocor Steuerprogramms (C. Zeiss, Jena) wurde ein Feld von  $2 \times 20$  Punkten definiert, deren Abstand

und uns zusammen mit einer Messkarte freundlicherweise durch die Fa. Zeiss zur Verfügung gestellt. Die in Kapitel 4.2 beschriebene Auswertung, sowie die grafische Darstellung der Intensitätshistogramme erfolgte über Perl-Routinen, die z.T. von Herrn H. Dunkel (MPI, Göttingen) erstellt wurden.

## Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Voraussetzung für die Untersuchung der Dynamik von Proteinen auf der Ebene einzelner Moleküle durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist deren effiziente Anregung im Messaufbau. Zur Markierung von Proteinen hat sich die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die primäre Aminofunktion von Lysinen oder an das N-terminale Ende des Proteins bewährt. Um eine ausreichende Zahl an Photonen je Molekül zu detektieren, werden die Farbstoffe in der FCS bis zur Sättigung, d.h. mit Intensitäten von mehr als  $10 \text{ kW/cm}^2$  angeregt. Viele Farbstoffe, so das häufig zur Proteinmarkierung eingesetzte Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), unterliegen dabei in einem hohen Maße Bleich- und Tripletprozessen. Andererseits wird die Fluoreszenz von bewährten Farbstoffen der FCS, so z.B. von TMR und Rhodamin Green, bei Kopplung an Proteine stark gelöscht [79].

## Evaluierung der Fluoreszenzfarbstoffe

Verschiedene kommerziell zur Kopplung an Proteine verfügbare Farbstoffe wurden auf die Verwendung in der FCS geprüft. Entscheidend ist einerseits die maximale Anzahl detektierbarer Photonen je Molekül und Sekunde (cpms), sowie der Anteil der Moleküle im Tripletzustand. Für die Anregung bei 488nm erwiesen sich die Fluoresceinderivate Oregon Green und Alexa488 als optimal für die Anwendung in der FCS, wobei der Alexa488-Farbstoff erst im Laufe dieser Arbeit erhältlich wurde (s. Tab. 3.4). Für die Anregung bei 633nm konnte zur Proteinmarkierung der bereits in der FCS etablierte Cyaninfarbstoff Cy5 eingesetzt werden.

## Markierung des Prionproteins

Bei der Derivatisierung von Proteinen besteht stets die Gefahr, die Eigenschaften des markierten Proteins zu beeinflussen. Um den Einfluss des Fluorophors zu mi-

Tabelle 3.4: Relative Quantenausbeute und Triplettanteil von Fluoreszenzfarbstoffen zur Proteinmarkierung, Anregung bei 488nm (Cy5 633nm), Leistung 50  $\mu$ W, Fokusbereich 0,44  $\mu$ m.

	cpms [kHz]	Triplet [%]	Photostabilität
FITC	13	60	-
Oregon Green	21	45	+
Cy2	14	36	(+)
Alexa 488	80	32	++
Cy5 (rot)	70	35	++

gewählt wurden bei allen Markierungsansätzen Bedingungen gewählt, die zu einer unvollständigen Markierung des Proteins führten, so dass maximal ein Farbstoffmolekül an ein Proteinmolekül gekoppelt wurde.

Zur Markierung des PrP mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 (rot), bzw. Oregon Green 488 oder Alexa 488 wurde ein aminoreaktiver Succinimidylester des Farbstoffes an eine primäre Aminogruppe eines Lysins des Proteins gekoppelt. Ein Aliquot des Farbstoffes (ca. 100  $\mu$ g) wurde in 50  $\mu$ l DMSO gelöst. Jeweils 3  $\mu$ l des Farbstoffes wurden zu 100  $\mu$ l rPrP (90-231) (100  $\mu$ g/ml) in NaP2 zugegeben und in der Dunkelheit 1 h bei RT gerührt. Mikrospinsäulen (Mobitec) mit Sephadex G-75 (Pharmacia) wurden mit 3 \* 350  $\mu$ l PBSS equilibriert (Zentrifugation 1 min, 750 g). Nach der Reaktion wurde das Produkt von überschüssigem Farbstoff über zwei Mikrospinsäulen getrennt (Zentrifugation 3 min, 750 g).

Der Anteil markierter Moleküle betrug für PrP-Oregon Green 4 % und für PrP-Cy5 14 % unter Annahme eines Fluorophors/Proteinmolekül (s. Kap. 3.3.4).

### Markierung der Antikörper

Mikrospinsäulen (Mobitec) mit Sephadex G-15 (Pharmacia) wurden mit 3 \* 350  $\mu$ l PBSN equilibriert (Zentrifugieren 1 min, 750 g). 5-20  $\mu$ l Antikörper (c = 0.1 - 1 mg/ml) wurden mit PBSN auf 30  $\mu$ l aufgefüllt und über die Spinsäule in PBSN Puffer überführt (Zentrifugation 3 min, 750 g). Nach Zugabe von 3  $\mu$ l NaC und 1.5  $\mu$ l Cy5 bzw. 3  $\mu$ l Oregon Green oder Alexa 488 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l in DMSO) wurde ü.N. bei 4°C stengelassen. Die markierten Antikörper wurden über eine Mikrospinsäule

mit Sephadex G-75 (Pharmacia) gereinigt (3 min, 750 g), die mit PBSN äquilibriert war. Nach erneuter Elution mit 30  $\mu$ l PBSN wurde eine zweite Fraktion markierter Antikörper erhalten. Konzentration des Antikörpers und Anteil an freiem Farbstoff ( $\leq 5\%$ ) wurden durch Autokorrelationsmessung in der FCS bestimmt.

### Bestimmung des Markierungsverhältnisses

Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (Lambda 17, Perkin Elmer) bestimmt. Anhand des Absorptionsspektrums des freien Farbstoffes wurde zur Korrektur der Konzentration des markierten Proteins das Absorptionsverhältnis  $\alpha = E_{280}^F / E_{max}^F$  des Farbstoffs bestimmt (Alexa488, Oregon Green:  $E_{max}^F = 495$  nm, Cy5:  $E_{max}^F = 650$  nm). Die Konzentration des markierten Proteins  $c_P$  berechnet sich nach:

$$c_P = E_{280}(1 - \alpha E_{max}) \cdot 1(g/l)^{-1} 1/m [M] \quad (3.1)$$

mit  $m$  als Molmasse des Proteins (g/mol). Die Konzentration des Fluorophors  $c_F$  berechnet sich anhand des Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs  $\epsilon$ :  $c_F = E_{max}^F \cdot \epsilon$  ( $\epsilon_{OregonGreen} = 7.0 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ ,  $\epsilon_{Alexa488} = 7.1 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ ,  $\epsilon_{Cy5} = 2.5 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ ). Das Verhältnis von  $c_F/c_P$  bezeichnet die mittlere Zahl der Fluorophore pro Proteinmolekül.

### Konzentrationsbestimmung durch FCS-Messung

Die Endkonzentration der fluoreszenzmarkierten Sonden, sowie der Anteil an freiem Farbstoff wurde nach Gleichung 2.25 durch Autokorrelationsmessungen bestimmt. Der Strukturparameter  $z_0/\omega_0$ , sowie die Diffusionszeit des freien Farbstoffs wurde anhand von Autokorrelationsmessungen von Alexa488- und Cy5-Farbstofflösungen bestimmt. Das effektive Detektionsvolumen  $V \approx 1.3 \times 4/3\pi\omega_0^2 z_0$  (s. Gl. 2.22) wurde anhand der Messung einer Rhodamin Green Lösung ( $D_{RG} = 2.8 \cdot 10^{-10} m^2 s^{-1}$ ) über  $\omega_0 = (4D\tau_D)^{-1/2}$  (s. Gl. 2.21) berechnet. Die Größe des Messvolumens betrug für das x40 Objektiv 0.4 fl ( $\omega_0 = 0.25 \mu m$ ,  $\tau_D = 55 \mu s$ ) und für das x63 Objektiv 0.2 fl ( $\omega_0 = 0.19 \mu m$ ,  $\tau_D = 32 \mu s$ ).

## PrP-Aggregationsexperimente

Proteinlösungen wurden im Verhältnis PrP-Oregon Green / PrP-Cy5 4:1 gemischt, um ein äquimolares Verhältnis der markierten Proteine zu erhalten. Bei Proteinlösung wurde mit PBS + 0.2 % SDS (w/v) auf die 20-fache Konzentration der Messung eingestellt. Um den Aggregationsprozess zu initiieren wurde das Protein 20-fach mit PBS auf eine SDS Konzentration von 0.01 % verdünnt und in den Probenträger gegeben. Referenzproben wurden entsprechend in PBS + 0.2 % SDS verdünnt.

Im beschriebenen Messaufbau wurde eine Serie von Korrelationskurven des Aggregationsansatzes aufgenommen wobei die Messzeit der Einzelmessungen 15 s für Auto- und 30 s für Kreuzkorrelationsmessungen betrug. Die Auswertung erfolgte nach Gleichungen 2.25 und 2.33 über einen nichtlinearen Marquardt-Algorithmus durch die Auswertungssoftware FCS-Access (Evotec Biosystems, Hamburg). Für die Auswertung der Kreuzkorrelationskurven wurde eine Diffusionskomponente verwendet, die Autokorrelationskurven wurden durch eine Komponente für den freien Fluoreszenzfarbstoff (Oregon Green: 55  $\mu$ s, Cy5 90  $\mu$ s) und eine zweite für das PrP angepasst. Der Strukturparameter  $z_0/\omega_0$  wurde durch Messung der freien Farbstoffe bestimmt und im Folgenden fixiert.

## SIFT-Messungen

Für das 'Scannen intensiv fluoreszierender Targetmoleküle' (SIFT), d.h. für die Messung am diagnostischen Modellsystem von CJD und AD wurden *prion rods* bzw. A $\beta$ -Aggregate in der angegebenen Konzentration in Liquor bzw. Puffer in einem silanierten Probengefäß (G. Kisker, Mühlhausen) auf ein Volumen von 18  $\mu$ l verdünnt. 2  $\mu$ l einer Mischung fluoreszenzmarkierter Sonden in PBSN wurde zugegeben, so dass die Endkonzentration der Sonden 6 nM (Antikörper) bzw. 10 nM (PrP) betrug. Für die Messung der Liquorproben von AD und CJD Patienten wurde 2  $\mu$ l Sondenmix direkt zu 18  $\mu$ l Liquor zugegeben. Eine Messkapillare wurde kontaminationsfrei mit der Probe befüllt und anschließend versiegelt. Die Messung erfolgte für 300 s bzw. 600 s bei 22°C mit einer Scangeschwindigkeit von 1 mm/s. Kontaminiertes Material wurde durch Autoklavieren (2 h, 140°C) oder Behandlung mit 2 M NaOH (min. 2

h) dekontaminiert.

## A $\beta$ Aggregate

A $\beta$  Peptid (1–42) wurden in lyophilisierter Form von der Firma Bachem Feinchemikalien (Heidelberg) bezogen. Zur Erzeugung von voraggregiertem A $\beta$  (1–42) wurde das Peptid in DMSO gelöst ( $c = 5 \text{ mg/ml}$ ), auf eine Konzentration von  $10 \text{ }\mu\text{M}$  in AS-Puffer verdünnt, und 2 h inkubiert. Aliquots des Aggregationsansatzes wurden in PBSN auf die angegebene Konzentration verdünnt.

Für die Adsorptionsmessung wurde aggregiertes A $\beta$  (1–42) zunächst auf  $10 \text{ }\mu\text{M}$  in PBS verdünnt. Aliquots wurden in den untersuchten Medien 1:10 verdünnt, mit Antikörpermix versetzt (6E10–Cy5, pAB42–Alexa488,  $c = 6 \text{ nM}$ ), in die Messkapillare gefüllt und versiegelt. Messung und Lagerung erfolgte bei  $22^\circ\text{C}$  im SIFT–Aufbau (s. Kap. 3.2, Messzeit 300s, Binweite  $500\mu\text{s}$ , Schwelle  $8 \cdot I_{\text{max}}$ )

## Aufreinigung von Antikörpern

Antikörper 12F10 wurde über Protein G Affinitätschromatographie (MAbTrap G II, Pharmacia) aus serumfreiem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Säule wurde mit 5ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und mit 3 ml B-Puffer equilibriert. 15 ml Kulturüberstand wurden mit 15 ml B-Puffer versetzt und mittels einer sterilen Kunststoffspritze durch einen Membranfilter ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ , Millipore) auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 3 ml B-Puffer gespült, bis die Absorption ( $E_{280\text{nm}}$ ) des Durchlaufs auf den Wert des Puffers abgesunken war. Es wurde mit 4 ml E-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen aufgefangen, in denen jeweils  $20 \text{ }\mu\text{l}$  N-Puffer vorgelegt waren. Der Antikörper wurde in Fraktion 3 ( $400\mu\text{l}$ ) eluiert. Durch Absorptionsmessung wurde die Konzentration auf  $350 \text{ }\mu\text{g/ml}$  bestimmt. Es wurden 0.1 % (v/v) NP-40 und 0.005 %  $\text{NaN}_3$  zugegeben und das Produkt bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## Western Blot

Zur Konzentrationsbestimmung durch *Western blot* wurden *prion rods* in Liquor von Patienten ohne Anzeichen neurodegenerativer Erkrankungen verdünnt. Scrapie-infiziertes Hamsterhirn (Stamm 263 K) wurde mit 9 Teilen Lyse-Puffer homogenisiert und 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit Proteinase K ( $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Der Verdau



entlang der Kapillarrichtung 20 mm und 10  $\mu\text{m}$  quer zur Kapillare betrug. Die Punkte dieses Feldes wurden so angesteuert, dass die Kapillare relativ zum Mikroskopobjektiv mäanderrförmig mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bewegt wurde.

### Intensitätsanalyse

Sowohl Aufnahme der Spur der Fluoreszenzintensität als auch die Intensitätsanalyse erfolgten auf einem separaten Messrechner durch eine MCS-Karte (C. Zeiss, Jena). Histogramme der Fluoreszenzintensität wurden mit der Software Origin 6 (Microcal, Northampton, MA USA) erstellt. Ein Programm zur automatisierten Erstellung von Intensitätshistogrammen wurde von Herrn M. Loth (C. Zeiss, Jena) erstellt wurde durch Zugabe von 5 mM PMSF und Aufkochen in Auftragspuffer gestoppt. 10  $\mu\text{l}$  wurden auf einem 12.5 % SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel getrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad, CA) wurde das PrP durch Inkubation mit 3F4 als Primär-Antikörper und an alkalische Phosphatase gekoppeltem Ziege-anti-Maus Sekundär-Antikörper detektiert. Die Phosphataseaktivität wurde durch das CDP-Star Chemilumineszenz-System (Tropix Inc., Bedford MA) auf Hyperfilm ECL (Amersham, IL) sichtbar gemacht wie von den Herstellern angegeben. Der Nachweis von rPrP erfolgte analog, jedoch ohne PK-Verdau. Wo erforderlich, wurde das PA-Gel anschließend mit Coomassie Blau angefärbt (30 min, RT).

## Ergebnisse

Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, lassen sich zwei thematischen Komplexen zuordnen. Der erste Themenkomplex umfasst die Untersuchung des Aggregationsprozesses des Prionproteins PrP durch Messungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Als Modellsystem diente ein rekombinant hergestelltes Fragment des Hamster-PrP, im Folgenden kurz rPrP (90-231) genannt, das in seiner Aminosäuresequenz dem proteaseresistenten Kern des pathologischen PrP<sup>Sc</sup> entspricht. Dieser Kern des PrP<sup>Sc</sup> bildet fibrilläre Aggregate, in denen die Infektiosität erhalten bleibt [96]. Zur Untersuchung in der FCS mussten die PrP-Moleküle zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, der sich einerseits mit hoher Quanteneffizienz anregen lässt, der andererseits aber möglichst wenig mit den Eigenschaften des Proteins interferiert.

Der Prozess der Selbstaggregation des rPrP (90-231) wurde anhand von Messungen in der Zweifarben-Kreuzkorrelations-Fluoreszenzspektroskopie, kurz Kreuzkorrelations-FCS, untersucht. Unter Verwendung von rot markierten und grün markierten Molekülen lässt sich durch die Kreuzkorrelations-FCS direkt der Anteil an doppelt markierten Molekülen bestimmen. Mit diesem Ansatz konnte der Aggregationsprozess insbesondere in seiner initialen Phase untersucht werden, in der die Multimere noch klein sind, und sich aufgrund ihrer Diffusionszeit noch nicht exakt von den Monomeren trennen lassen. Im Übergang von Monomeren zu hochmolekularen Aggregaten ließen sich mehrere Phasen des Aggregationsprozesses differenzieren. Es zeigte sich auch, dass eine große Zahl fluoreszenzmarkierte PrP-Monomere an ein Aggregat angelagert werden.

Die Anlagerung zweier Arten fluoreszenzmarkierter Sonden an ein pathologisches Aggregat ließ sich zum Nachweis einzelner Aggregate oder, allgemeiner, Zielmoleküle in Lösung nutzen. Die Weiterentwicklung dieses Prinzips zu einem hochempfindlichen Detektionsverfahren und dessen Anwendung in der Liquordiagnostik der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD) und von Morbus Alzheimer bildeten den zweiten Themenkomplex der vorliegenden Arbeit. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren entwickelt, um das Signal einzelner hochmarkierter Aggregate vom Hintergrund der Sondenmoleküle zu trennen und zu quantifizieren. Durch Verwendung hochaffiner Antikörper als Sondenmoleküle ließen sich Detektionssensitivität und -spezifität entscheidend steigern. Der Einsatz zweier unterschiedlich markierter Sonden erlaubte es weiterhin, das spezifische Signal markierter Aggregate von dem unspezifischen Signal aggregierter Sondenmoleküle zu trennen. Weiterhin ließen sich die Aggregate anhand der relativen Bindungsaffinität der Sonden charakterisieren. Experimentell konnten mit diesem Ansatz verschiedene Typen des pathologischen Prionproteins, die sich in ihrer Konformation unterscheiden, differenziert werden. Die Sensitivität der Detektion wurde an einem Modellsystem von pathologischen PrP-Aggregaten, sogenannten *prion rods*, evaluiert und mit der Kreuzkorrelationsanalyse verglichen. Die Untersuchung der diagnostischen Modellsysteme zeigt zugleich auch die Grenzen des Verfahrens und Ansatzpunkte zu weiteren Entwicklungen.

Sowohl in Liquorproben von Creutzfeld-Jakob Patienten als auch von Alzheimerpatienten ließen sich pathologische Aggregate nachweisen, die spezifisch für die jeweilige Erkrankung waren. Im Falle von CJD war dies der erste direkte Nachweis des Erregers in Liquor.

## Aggregation des Prionproteins

Das rPrP (90-231), das als Modellsystem der Prionaggregation untersucht wurde, besitzt einige der Eigenschaften des PrP<sup>Sc</sup>. Wie von Post *et al.* gezeigt, lässt sich durch Lösen des Proteins in 0.2 % (w/v) des ionischen Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und anschließendes Ausdünnen des Detergenz eine Strukturumwandlung  $\alpha$ -helikaler Bereiche in  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen induzieren. Gleichzeitig wird ein Aggregationsprozess initiiert.

Nach 24 stündiger Inkubation des Proteins in 0.01 % SDS ließ sich ein Teil des

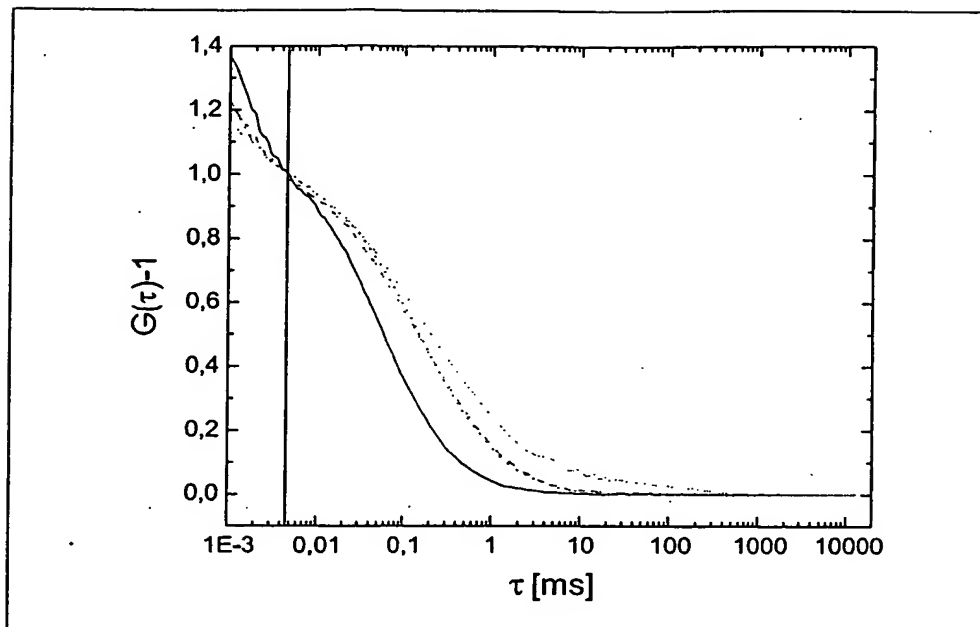
Tabelle 4.1: Abtrennung von aggregierten rPrP (90-231) durch Ultrazentrifugation. Die Proteine wurden bei der angegebenen Konzentration an SDS für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung der Aggregate erfolgte durch Ultrazentrifugation für 1h bei 10<sup>5</sup> g. Überstand (Üb) und Pellet (P) wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden mittels *Western blot* und Coomassie-Färbung nachgewiesen (s. Kap. 3.5.3).

	rPrP		rPrP-OrG		rPrP-Cy5		BSA	
SDS [%]	P	Üb	P	Üb	P	Üb	P	Üb
0.2	-	+	-	+	-	+	-	+
0.01	+	+	+	+	(+)	+	-	-

PrP(90-231) durch Ultrazentrifugation pelletieren, während es bei 0.2 % SDS vollständig in Lösung blieb. Das als Referenz verwendete BSA blieb unter beiden Bedingungen vollständig in Lösung (s. Tab. 4.1).

Der Austausch eines Teils des Proteins durch das fluoreszenzmarkierte Derivat ermöglichte es, die Größenänderung der markierten Partikel und damit den Aggregationsprozess anhand der Fluoreszenzkorrelation zu verfolgen. Abbildung 4.1 zeigt die Korrelationskurven des Prionproteins vor Initiation des Aggregationsprozesses, PrP nach 1 h Inkubation sowie das pelletierte und resuspendierte PrP nach 24 h. Die Kurven wurden nach dem Modell für die dreidimensionale Diffusion (s. Gl. 2.24) mit zwei Diffusionskomponenten für das Protein und einer zweiten für den freien Farbstoff angepasst. Die Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  nahm beim Ausdünnen des Detergenz um etwa 20 % zu. In der pelletierten Probe war eine erhebliche Erhöhung der Diffusionszeit festzustellen. Die Korrelationkurve ließ sich zudem nur unzureichend durch ein Modell mit zwei Diffusionskomponenten anpassen. Die Größe der Moleküle war offenbar heterogen, ein Teil des Proteins lag dabei in einer hochaggregierten Form vor.

In der Intensitätsspur der Fluoreszenz zeigte sich diese hochaggregierte Komponente durch das Auftreten von Spitzen im Fluoreszenzsignal, die deutlich aus den sonstigen Signalfluktuationen herausragten (s. Abb. 4.2). Im Folgenden werden diese Signale kurz Peaks genannt.

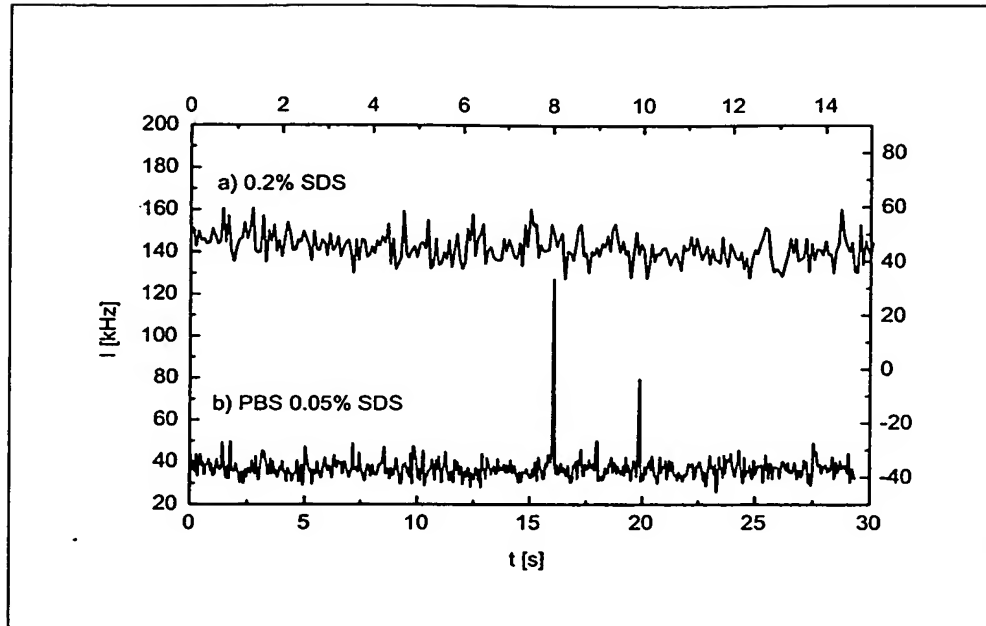


Figur 4.1: Autokorrelationskurven des markierten rPrP(90-231)- Oregon Green (OrG).  $c(\text{PrP})=100\text{nM}$ ,  $C(\text{PrP-OrG})=4\text{nM}$ ) Linie: Farbstoff Oregon Green, Punkte: 0.2% SDS, Striche: 0.01% SDS, Strichpunkte: pelletiertes rPrP, Bedingungen wie in Tab. 4.1. Der Diffusionsanteil der Korrelationskurven wurde auf eine Amplitude von 1 normiert.

### Korrelationsanalyse des Aggregationsprozesses

In den weiteren Untersuchungen wurde der Verlauf des Aggregationsprozesses durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie verfolgt. Die unterschiedlichen Messansätze liefern mehrere, z. T. komplementäre Parameter.

- Diffusionszeit und Amplitude der Autokorrelationsfunktion erlauben, die Größe und die Gesamtkonzentration  $N$  der markierten Moleküle zu bestimmen. In binären Mischungen von Molekülen unterschiedlicher Größe lassen sich die Mischungsanteile nur dann sicher bestimmen, wenn zuvor die Diffusionszeiten bestimmt wurden und keiner der Anteile der Komponenten unter 10 % liegt. Mischungen mit mehr als zwei Komponenten lassen sich in der Regel nicht sicher charakterisieren.
- Diffusionszeit und Amplitude der Kreuzkorrelation erlauben die Bestimmung

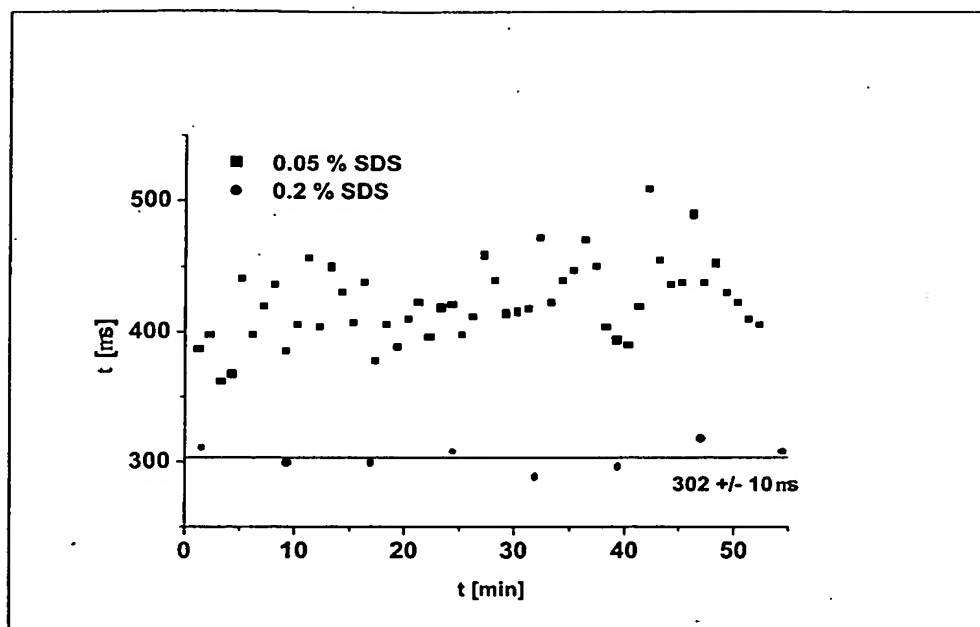


Figur 4.2: Fluoreszenzspur des markierten rPrP(90-231)-Cy5 bei einer Binweite von 50 ms.  $c(\text{PrP}) = 30 \text{ nM}$ ,  $c(\text{PrP-Cy5}) = 4 \text{ nM}$  a) 0.2 % SDS, b) 0.05 % SDS Inkubation 24 h bei  $37^\circ \text{C}$ .

der Konzentration und Größe solcher Partikel, die mindestens ein Fluorophor jeder Farbe enthalten. Eine doppelt markierte Komponente kann bis zu einem Anteil von wenigen Prozent am Gesamtsignal von einfach markierten Molekülen separiert und charakterisiert werden.

- Die Fluoreszenzintensität je Molekül ist ein Maß für die Zahl der gebundenen Fluorophore und damit auch der gebundenen monomeren Proteineinheiten. Damit kann sie ebenfalls zur Bestimmung der Aggregatgröße dienen. Ohne Eichmessungen erlauben Quenchingeffekte jedoch nur eine qualitative Abschätzung.

Beim Ausdünnen des Detergenz zeigte die Autokorrelationsanalyse des markierten Prionproteins zunächst eine Erhöhung der Diffusionszeit um 15-25 %, die bereits innerhalb der Probenvorbereitungszeit ( $< 1 \text{ min}$ ) erfolgte. Im Verlauf einer Stunde stieg die Diffusionszeit nur schwach an (s. Abb. 4.3).

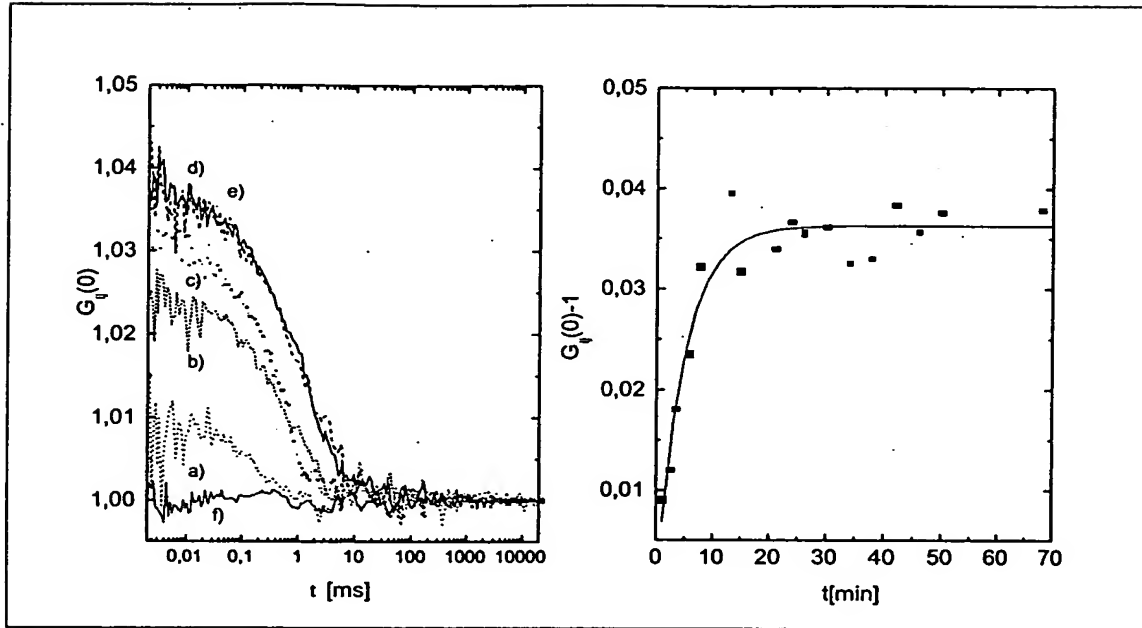


Figur 4.3: Mittlere Diffusionszeiten  $\tau_{Diff}$  des markierten rPrP(90-231)- Oregon Green.  $c(\text{PrP})=50\text{nM}$  Punkte: 0.2% SDS, Quadrate 0.05% SDS. Die Diffusionszeit wurde durch Anpassung an ein Diffusionsmodell mit zwei Komponenten ermittelt. Die Diffusionszeit des freien Farbstoffs wurde separat bestimmt und auf  $52 \mu\text{s}$  fixiert.

Eine 30 %ige Zunahme der Diffusionszeit entspräche bei globulären Molekülen einer Verdoppelung des Molekulargewichtes, also einer Dimerisierung. Inwieweit sich die Komponenten einer Mischung in der Korrelationsanalyse trennen lassen, hängt entscheidend von der Glätte der Messkurve, d.h. vom Signal / Rausch-Verhältnis ab. In einem typischen FCS-Aufbau können durch Korrelationsanalyse nur Komponenten voneinander getrennt werden, deren Diffusionszeit sich mindestens um den Faktor 1.6 unterscheidet [76]. Es lässt sich auf diese Weise also keine Aussage treffen, ob eine quantitative Dimerisierung erfolgt ist oder eine Mischung aus monomeren und oligomeren PrP Molekülen vorliegt.

### Initiale Phase des Aggregationsprozesses

Wesentlich genauer als im Autokorrelationssignal lässt sich der Verlauf des Aggregationsprozesses in der Kreuzkorrelations-FCS verfolgen. Dabei wird ein Teil des

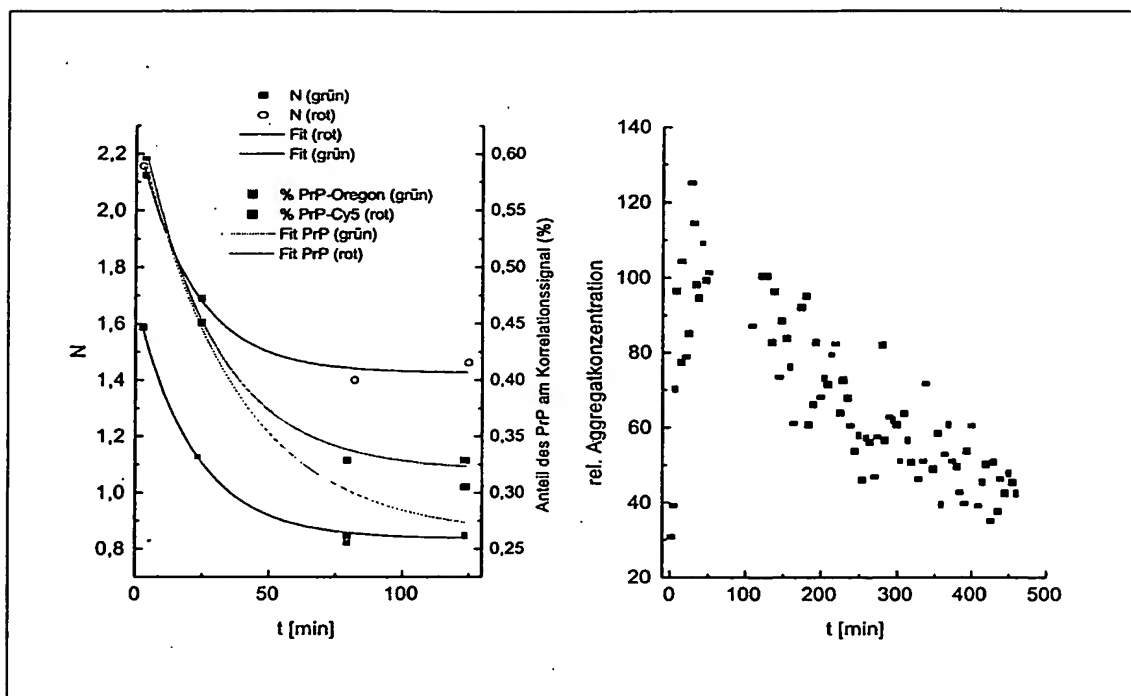


Figur 4.4: Kreuzkorrelationsmessung des markierten rPrP(90-231) . Der Aggregationsprozess wurde durch Verdünnen von 0.2% auf 0.01% SDS initiiert,  $c(\text{PrP})=50\text{nM}$ ,  $c(\text{PrP-Cy5})=2\text{nM}$ ,  $c(\text{PrP-OrG})=2\text{nM}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$ . Links: Kreuzkorrelationskurven  $G(\tau)$  zum Inkubationszeitpunkt  $t$ : a) 1 min, b) 6 min, c) 20 min, d) 30 min, e) 130 min, f) Referenzmessung in 0.2% SDS. Rechts: Initiale Kreuzkorrelationsamplitude während der Aggregation von rPrP(90-231) (Box). Die Bildung von Partikeln, die sowohl rote als grüne Fluorophore inkorporiert haben, lässt sich durch eine irreversible Bindungsreaktion  $A_i + B_i \rightarrow AB_{ij}$  zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $2 \cdot 10^{-6} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  modellieren (Linie).

PrP mit einer grünen Fluoreszenzmarkierung und ein anderer Teil mit einer roten Markierung versehen. Wiederum liegt unmarkiertes PrP im Überschuss vor. Da in den Zähler der Kreuzkorrelationsfunktion nur solche Moleküle eingehen, die Fluorophore beider Farben tragen, ist die Amplitude der Kreuzkorrelation bei konstanter Gesamtzahl der Fluorophore ein direktes Maß für die Konzentration doppelt markierter Moleküle (s. Gl. 2.31). In das Kreuzkorrelationssignal gehen also ausschließlich dimere, oligomere und multimeren Proteinaggregate ein.

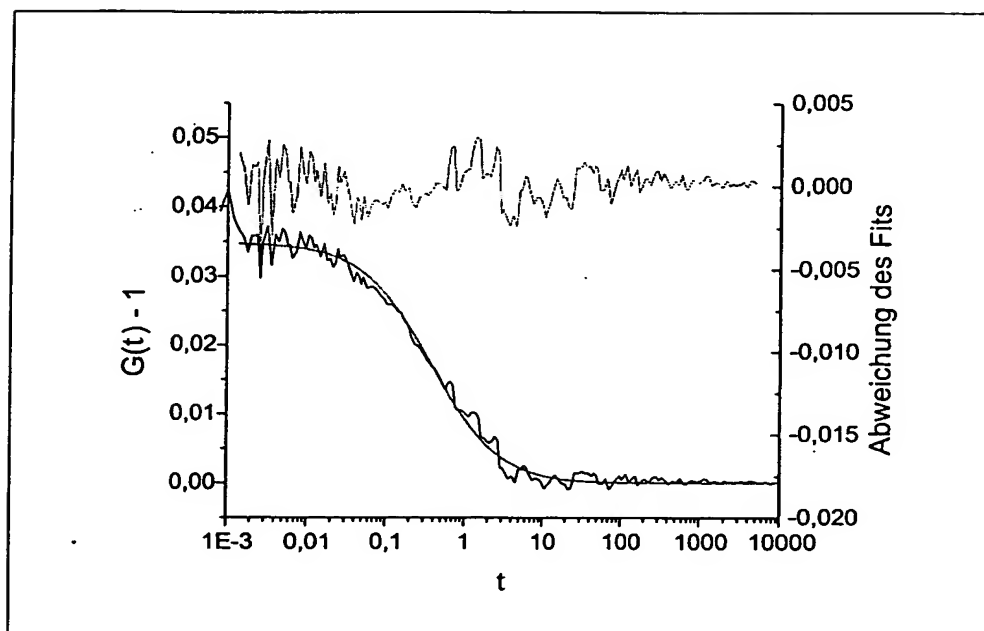
Abbildung 4.4 zeigt Kreuzkorrelationskurven zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einleitung des Aggregationsprozesses. Bei einer PrP-Konzentration von 50 nM stieg





Figur 4.5: *rechts*: Korrigierte Aggregatkonzentration der Aggregation von rPrP(90–231) der Messung 4.4. *links*: Auftragung der Fluorophorkonzentration  $N$  und des Anteils von PrP am Korrelationssignal gegen  $t$ . Beide Größen wurden aus den Autokorrelationsfunktionen bestimmt (s. Gl. 2.24). Die Abnahme von  $N$  ließ sich durch den Term  $N = N_0 e^{-t/t_0}$  anpassen ( $t_0$  (rot, grün) = 20 min).

die Amplitude des Kreuzkorrelationssignals innerhalb von 20 min auf einen konstanten Wert an (s. Abb. 4.4 rechts). Im Zeitbereich von Stunden fiel sie dagegen wieder ab (s. Abb. 4.5). Die initiale Zunahme der Amplitude bis zu einem Sättigungswert lässt sich durch einen quantitativen Bindungsprozess beschreiben. Aus dem einfachsten Modell einer Bindungsreaktion, einer irreversiblen bimolekularen Assoziationsreaktion, resultiert eine Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von etwa  $2 \cdot 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ .

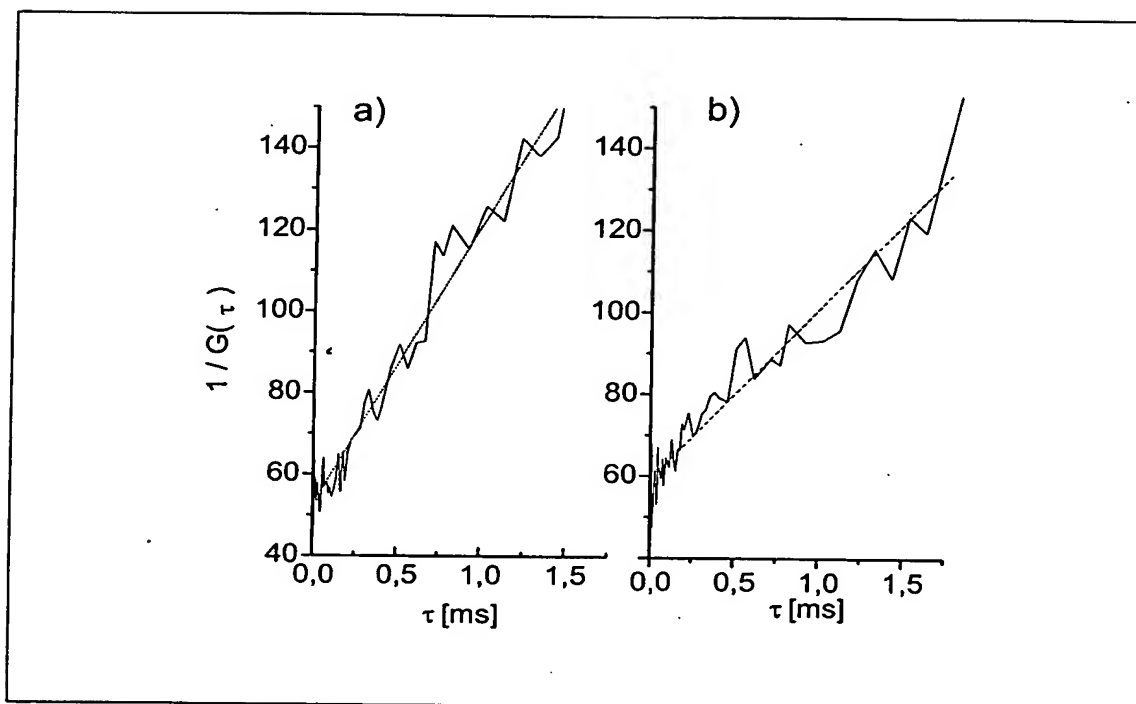


Figur 4.6: Anpassung einer Kreuzkorrelationskurve der Aggregation von rPrP(90-231) aus Messung 4.4 mit einer Diffusionskomponente nach Gl. 2.33 und Residuen.

### Aggregatgröße

Nahm man für den initialen quantitativen Bindungsschritt bei niedriger PrP-Konzentration an, dass zunächst Di- oder Oligomere gebildet werden, die nur ein Fluorophor jeder Farbe inkorporiert haben und deren Größenverteilung relativ eng ist, so ließen sich diese Oligomere näherungsweise nach Gl.2.33 durch eine einzelne Diffusionskomponente des Kreuzkorrelationssignals beschreiben. Abbildung 4.6 zeigt die Güte der Anpassung für eine Einzelmessung für  $t = 30$  min. Systematische Abweichungen des Fits liegen innerhalb der Fehlergrenzen der Messdaten. Eine detailliertere Auswertung des Korrelationssignals wäre nur bei einer größeren Glätte der Kurven sinnvoll, die jedoch durch die Messzeit im Rahmen der kinetischen Messung begrenzt ist.

Aufschluss über eine Heterogenität der Molekülverteilung kann auch die invers lineare Auftragung des Kreuzkorrelationssignals nach Gl. 2.35 geben. Für ein heterogenes System mehrerer Komponenten ist eine deutliche Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen  $G(\tau)^{-1}$  und  $\tau$  zu erwarten. Abbildung 4.7 zeigt die inverse

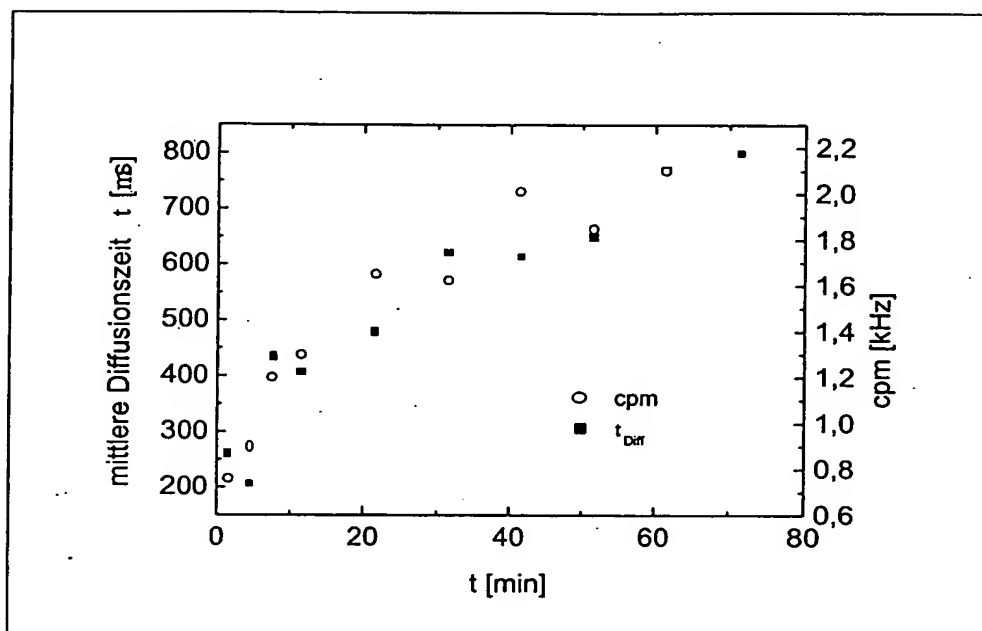


Figur 4.7: Invers-lineare Auftragung der Kreuzkorrelationsamplitude im Verlauf der Aggregation von rPrP(90-231) der Messung aus Abb. 4.4 a)  $t = 2$  min, b)  $t = 260$  min.

Auftragung von  $G(\tau)$  bei  $t = 2$  min und  $t = 266$  min. Die zweite Messung zeigt dabei eine stärkere Abweichung vom linearen Funktionszusammenhang.

Die mittlere Diffusionszeit des Kreuzkorrelationssignals stieg im Verlauf des Aggregationsprozesses an. Ihr Anstieg verlief dabei deutlich langsamer als der Anstieg der Kreuzkorrelationsamplitude (s. Abb. 4.8). Dies deutet darauf hin, dass die initial gebildeten Di- und Oligomere durch Anlagerung weiterer Mono- oder Oligomere in ihrer Größe wachsen. Die Inkorporation weiterer Monomere ließ sich parallel zur Diffusionszeit auch anhand der relativen Fluoreszenzausbeute verfolgen. Durch den Einbau weiterer markierter PrP-Moleküle nahm die Zählrate pro doppelt markiertem Molekül (cpms) zu. Wie Abb. 4.8 zeigt, korrelierte die Zunahme der Zählrate mit der Zunahme der Diffusionszeit.

Die Anpassung der Messdaten zeigt, dass die Größe der aggregierten Moleküle im weiteren Reaktionsverlauf nicht homogen blieb, sondern zunehmend heterogen wurde. Durch die Messung der mittleren Diffusionszeit im Kreuzkorrelationssignal

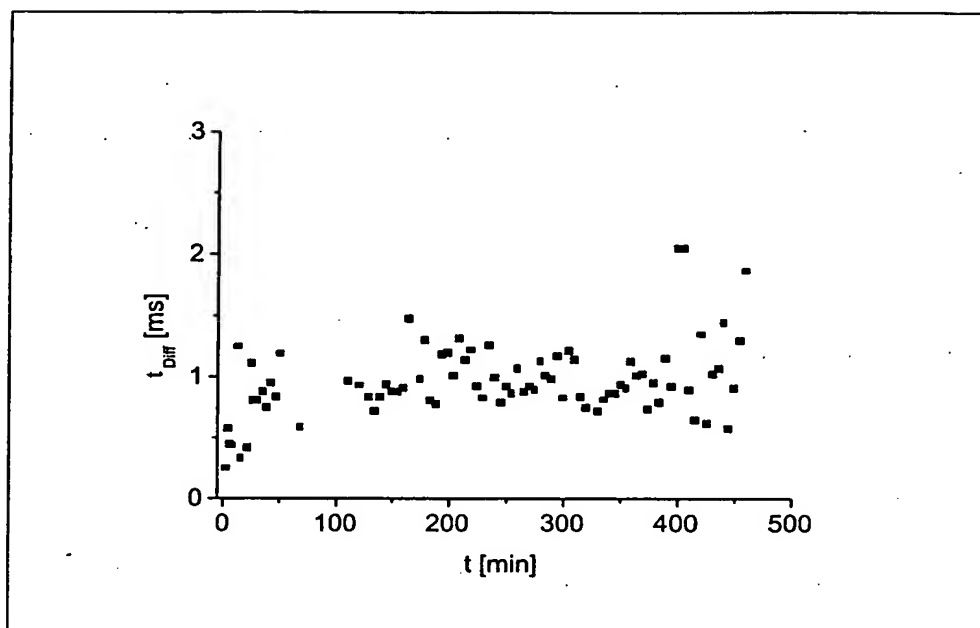


Figur 4.8: Initiale Zunahme von Diffusionszeit und Zahl der detektierten Photonen der doppelt markierten Moleküle während der Aggregation von rPrP(90-231). Mittlere Diffusionszeit ( $\tau$ ) und relative Quanteneffizienz (cpm) wurden aus dem Kreuzkorrelationssignal der Aggregationsmessung aus Abb. 4.4 durch Anpassung einer Diffusionskomponente bestimmt.

wurde damit eine mittlere Molekülgröße bestimmt. Auf eine Heterogenität der Aggregatgröße deutet insbesondere die relativ starke Streuung der Aggregationszeiten im Laufe einer Messreihe hin. Mit zunehmender Messzeit nahm diese Streuung zu, und es traten vermehrt einzelne multimere Aggregate auf (s. Abb. 4.9). Da auch die Markierungsdichte zunahm, hatte schon die Detektion eines einzelnen großen Aggregates entscheidenden Einfluss auf das Kreuzkorrelationssignal.

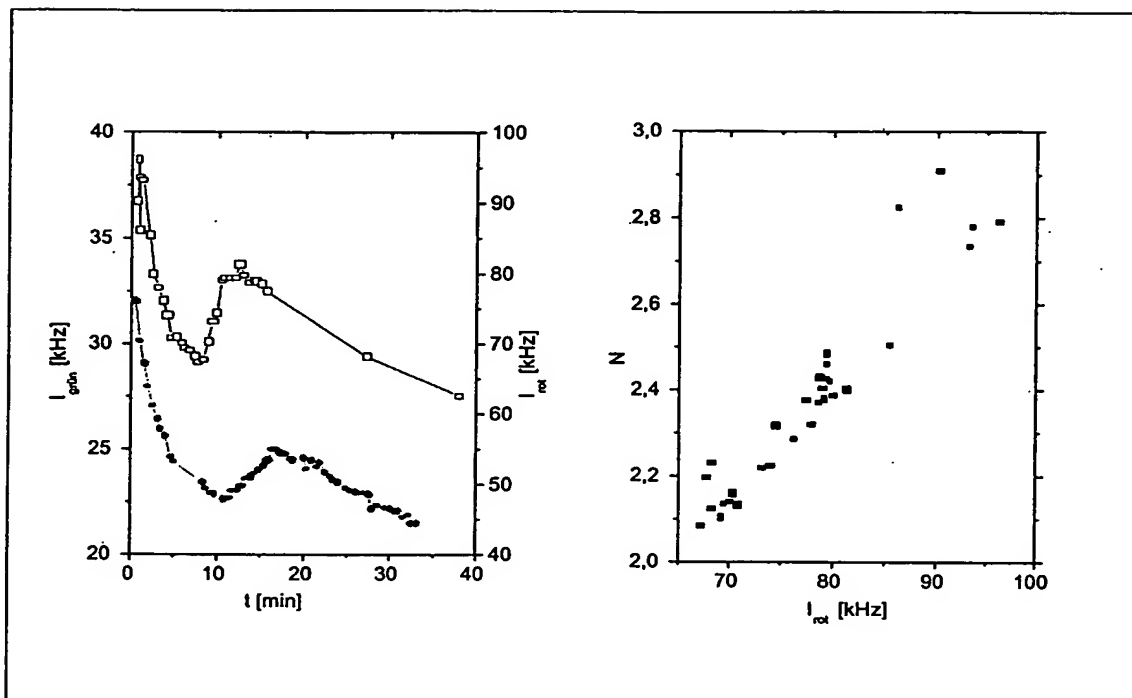
### Adsorptions- und Quenchingeffekte

Die langsame Abnahme der Kreuzkorrelationsamplitude, die im Zeitbereich über 30 min zu beobachten ist (s. Abb. 4.5), kann im wesentlichen durch zwei Prozesse verursacht werden. Zum einen nimmt durch den Aggregationsprozess die Zahl der Moleküle insgesamt ab. Bei diesem Prozess nimmt die Gesamtfluoreszenz nur



Figur 4.9: Diffusionszeit der doppelt markierten Moleküle während der Aggregation von rPrP(90-231). Die mittlere Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  wurde aus dem Kreuzkorrelationssignal der Aggregationsmessung aus Abbildung 4.4 durch Anpassung einer Diffusionskomponente bestimmt.

dann ab, wenn die relative Quantenausbeute der Monomere bei der Aggregation abnimmt. Zum anderen kann sich die Zahl der fluoreszierenden Moleküle durch Wandadsorption verringern. Bei diesem Prozess ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität proportional zur Abnahme der Konzentration, die aus der Amplitude der Autokorrelationskurven bestimmt wird. In Abbildung 4.10 (links) ist die Abnahme der Konzentration der beiden fluoreszenten Sonden während der Messzeit, in Abbildung 4.10 (rechts) das Verhältnis zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität aufgetragen. Beide sind im Verlauf der Messung proportional. Dies deutet darauf hin, dass Adsorptionseffekte entscheidenden Anteil an der Abnahme der Molekülkonzentration haben. Die Gesamtkonzentration der PrP Moleküle ( $N$ ) wurde experimentell über die inverse Amplitude der Autokorrelationsfunktion bestimmt (s. Gl. 2.22).  $N$  nimmt im Lauf des Aggregationsprozesses zunächst schnell ab, durchläuft ein Minimum, um nach kurzem Anstieg weiter abzufallen. Dieser Verlauf



Figur 4.10: *Rechts:* PrP-Konzentration im Verlauf der Aggregation von rPrP(90-231). Aufgetragen ist die Molekülzahl ( $N$ ), die aus der inversen Amplitude der Autokorrelationsfunktionen von a) rPrP-OrG (Box) und b) rPrP-Cy5 ( $\bullet$ ) im Verlauf der Aggregation bestimmt wurde. *Links:* Verhältnis von mittlerer Fluoreszenzintensität ( $I$ ) und Molekülzahl ( $N$ ) der Sonde rPrP-Oregon Green.  $N$  wurde aus der Amplitude der Autokorrelationskurven bestimmt.

lässt sich theoretisch sowohl durch einen quantitativen Oligomerisierungsprozess als auch durch Aggregatwachstum an einer begrenzten Zahl von Aggregationskeimen (*seeded aggregation*) beschreiben, wenn die Fluoreszenzquantenausbeute des Monomers bei der Oligomerbildung abnimmt.

Bei Änderung der Gesamtfluoreszenz, sei es durch eine Änderung der Molekülzahl oder der Fluoreszenzquantenausbeute, ist der Nenner der Kreuzkorrelationsfunktion (Gl.2.31) nicht mehr konstant. In diesem Fall muss zur Bestimmung der Konzentration doppelt markierter Moleküle aus der Kreuzkorrelationsamplitude eine entsprechende Korrektur erfolgen. Die Abnahme der PrP-Konzentration durch Adsorption lässt sich durch einen exponentiellen Term beschreiben ( $t_0 \simeq 20 \text{ min}$ ). Zugleich hal-

biert sich der Anteil des PrP am Gesamtfluoreszenzsignal von 60 % auf  $\sim 30$  % (s. Abb. 4.5 links). Auch in der korrigierten Auftragung der Aggregatkonzentration zeigt sich die schnelle initiale Bildung von Oligomeren. Im Verlauf des Aggregatwachstums nimmt die Konzentration der Aggregate ab.

Wünschenswert zur weiteren quantitativen Untersuchung des Aggregationsprozesses wäre eine weitgehende Unterdrückung der Adsorption. Dies wird in der Regel durch Zusatz von Detergenzien oder Proteinen wie Albumin erreicht. Diese Zusätze sättigen potentielle Bindungsstellen an der Gefäßwand. Gleichzeitig binden sie aber auch an hydrophobe Bereiche des Proteins. So konnte durch derartige Zusätze auch im untersuchten System die Adsorption des PrP unterdrückt werden. Dabei wurde jedoch gleichzeitig der Aggregationsprozess der PrP verhindert, so dass keine Zunahme der Kreuzkorrelationsamplitude oder der Diffusionszeit mehr zu beobachten war.

## Entwicklung eines liquordiagnostischen Verfahrens für CJD und Morbus Alzheimer

Die Aggregation unter Umwandlung der Sekundärstruktur in eine stärker hydrophobe Konformation ist ein grundlegendes Charakteristikum des Prionproteins. Wie auch im Fall der Alzheimerschen Erkrankung, die zur Bildung pathologischer Aggregate der A $\beta$ -Peptide führt, kann der Nachweis aggregierten Proteins die Basis eines diagnostischen Tests bilden. Zu diesem Zweck ist es erforderlich einzelne pathologische Aggregate nachzuweisen.

### Anlagerung an Aggregationskeime

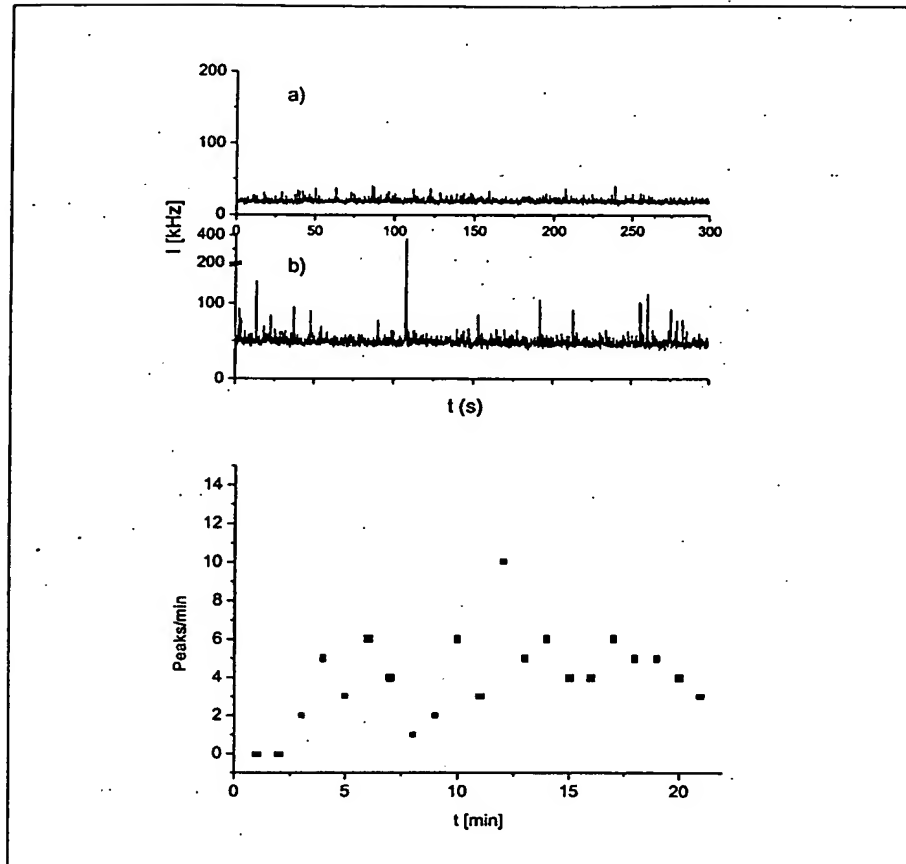
Durch Zugabe von monomeren fluoreszenzmarkiertem PrP zu einer Lösung von multimeren Aggregaten kann der Anlagerungsprozess der Monomere sichtbar gemacht werden. Auch im Laufe der *de-novo*-Aggregation traten zunehmend Fluoreszenzpeaks auf, die einzelnen multimeren Aggregaten des Prionproteins mit einer großen Zahl von gebundenen Farbstoffen zuzuordnen waren. Der Durchtritt solcher Aggregate durch das Fokallvolumen erzeugt einen Schauer von Fluoreszenzphotonen, im Folgenden kurz Burst genannt, durch den die Aggregate unmittelbar nachgewiesen werden können (s. Abb. 4.11).

Während die Selbstaggregation des Prionproteins im Konzentrationsbereich, der für die FCS relevant ist, jedoch erst im Zeitraum  $\geq 30$  min zu einer detektierbaren Menge an Multimeren führte, erfolgte die Anlagerung an präexistente Aggregate bereits innerhalb der Probenvorbereitungszeit, d.h. innerhalb von Minuten, quantitativ. Im weiteren Messverlauf blieb die Zahl der detektierten Aggregate pro Zeiteinheit konstant (Abb. 4.11 unten).

Auf der Basis dieser Ergebnisse boten sich folgende Strategien zur Markierung aggregierter Zielmoleküle an:

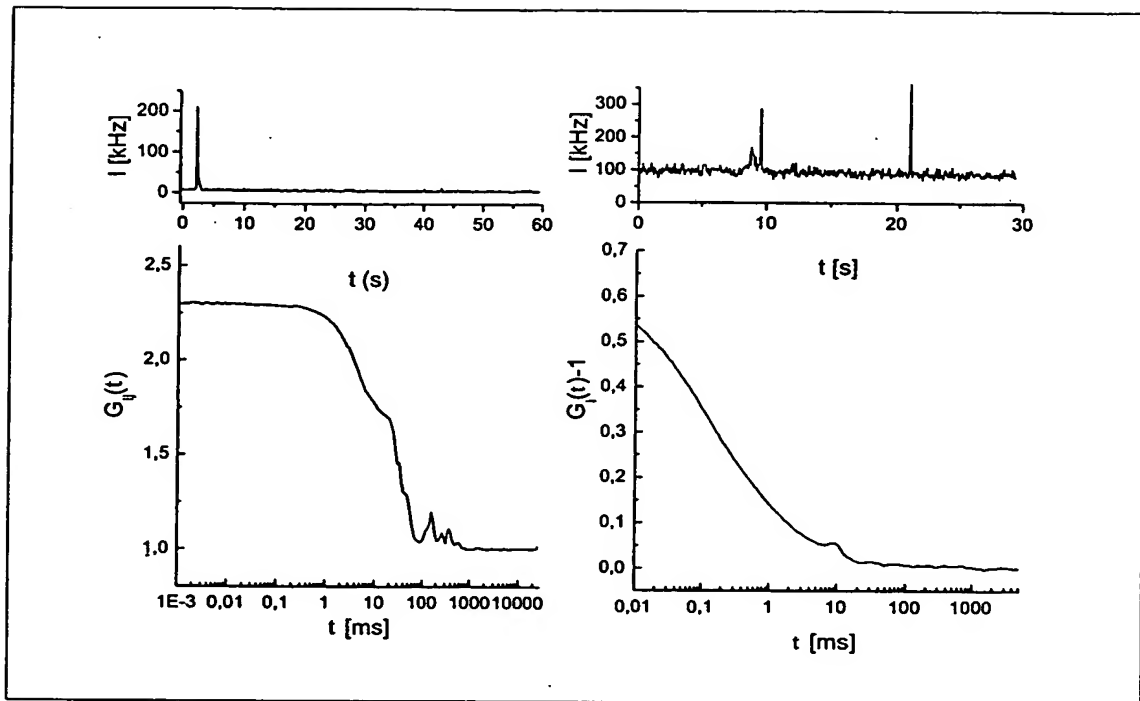
1. Koaggregation homologer fluoreszenter Monomeren (PrP oder A $\beta$ )
2. Koaggregation von heterologen fluoreszenzmarkierten Monomeren
3. Bindung spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper
4. gemischter Ansatz aus Monomeren und Antikörper-Sonden





Figur 4.11: Anlagerung von fluoreszenten Sonden an PrP-Aggregate. Spur der Fluoreszenzintensität  $I$  a) ohne Anwesenheit b) mit Anwesenheit von pathogenen PrP<sup>Sc</sup>-Aggregaten in Spinalliquor. Als Sonde diente rPrP-Cy2 ( $c = 10\text{nM}$ ), Anregung bei 488 nm, 180  $\mu\text{W}$ , Messzeit 21 min. Unten: Zahl der detektierten Aggregate je Zeiteinheit im Verlauf der Messung.

Die Markierung kann sowohl mit einer als auch mit zwei verschiedenen Sondenmolekülen erfolgen, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Markierungsstrategie bestimmt das Analyseverfahren, mit dem das Signal der fluoreszenzmarkierten Aggregate detektiert und quantifiziert werden kann. Die Entwicklung eines diagnostischen Systems für Prionkrankheiten und für Morbus Alzheimer kann dabei von der selben Grundidee, der Anlagerung von Sonden an einen Aggregationskeim, ausgehen. Seine Entwicklung ist im Folgenden dargestellt.



Figur 4.12: *Links:* Bestimmung der Aggregatgröße durch ein heterologes Sondenpaar. Voraggregiertes rPrP(90-231), monomere Konzentration  $0,1 \mu\text{M}$ , wurde durch ein Sondenpaar aus rPrP-Oregon Green ( $c = 2\text{nM}$ ) und dem Antikörper 15B3-Cy5 ( $c = 10\text{nM}$ ) detektiert. Gesamtmesszeit  $20 \pm 1 \text{ min}$ . Während der Einzelmessungen wurden nur einzelne markierte Aggregate detektiert, deren Durchtrittszeit anhand des Kreuzkorrelationssignals bestimmt wurde. Dargestellt ist Fluoreszenzspur und Kreuzkorrelationssignal einer Einzelmessung mit  $\tau \approx 15 \text{ ms}$ . *Rechts:* Homologe Detektion mit rPrP-Oregon Green.

### Abtrennung des Signals der Aggregate

Durch die klassische Korrelationsanalyse der Fluktuation des Fluoreszenzsignals kann die Diffusionsbewegung einzelner Moleküle quantitativ ausgewertet werden. Es wird dabei aus einer Vielzahl von Moleküldurchtritten die mittlere Fluktuationszeit bestimmt. Wenn während einer Einzelmessung nur wenige Durchtritte von hochmarkierten Aggregaten detektiert werden, hängt die gemessene Durchtrittszeit nicht nur von der Aggregatgröße, sondern auch entscheidend vom Weg der einzelnen Partikel durch das Messvolumen ab. Die Aggregatgröße kann daher anhand der Durchtrittszeit nur abgeschätzt werden.

Bei einer Sondenkonzentration von 10nM liegen die freien Sonden gegenüber den Aggregaten  $10^3$  bis  $10^6$  fach im Überschuss vor. Abbildung 4.12 zeigt den Durchtritt eines einzelnen Aggregates von rekombinantem Prionprotein, das mit einer Sonde in der Autokorrelations FCS beziehungsweise mit zwei unterschiedlich markierten Sonden in der Kreuzkorrelations-FCS detektiert wurde. Der Anteil des Aggregats betrug  $< 10\%$  des Autokorrelationssignals. Durch heterologe Detektion mittels einer Kombination von grün markiertem rPrP als einer und einem aggregatspezifischem PrP Antikörper (15B3) als anderer Sonde konnte das Signal multimerer Aggregate vollständig von dem Signal mono- und oligomerer PrP-Moleküle getrennt werden (s. Abb. 4.12 rechts). Es wurden Durchtrittszeiten der Aggregate von 3 - 50 ms bestimmt. Die mittlere Diffusionszeit entspricht einem Molekulargewicht von mehreren MDa.

Die Intensität der markierten Zielmoleküle liegt im Mittel 20 bis 50-fach über der Intensität der freien Sondenmoleküle. Dies entspricht demnach der Mindestanzahl von Sondenmolekülen, die an ein Aggregat gebunden sind. Da der Verlauf der Fluoreszenzintensität der Aggregation (Abb. 4.10) auf ein Quenching der Monomere im gebundenen Zustand schließen lässt, liegt die tatsächliche Zahl der gebundenen Sonden zumindest bei der Verwendung von Monomeren vermutlich höher. Durch die große Zahl an gebundenen Fluorophoren lassen sich einzelne Moleküldurchtritte unmittelbar nachweisen.

Jedoch sind bei einer Konzentration der Aggregate im sub-picomolaren Bereich auf diese Weise nur wenige Zielmoleküle in einer Probe zu detektieren. Für ein 1000-mer in femtomolarer Konzentration ergibt sich nach Gleichung 2.29 bei einem Fokusbereich von  $0.4\ \mu\text{m}$  eine Eintrittsfrequenz von  $0.5 \cdot 10^{-3}\text{s}^{-1}$ , was etwa zwei Teilchen je Stunde entspricht [36]. Zum limitierenden Faktor wird somit die Zahl der Durchtritte von Aggregaten durch den Messfokus, die wiederum durch die langsame Diffusion der Aggregate begrenzt wird.

Mit der Fluoreszenzintensität und der Kreuzkorrelation stehen somit zwei Parameter zur Verfügung, mit der einzelne Zielmoleküle auch bei einem hohen Überschuss freier Sonden detektiert werden können.

Bei Experimenten zum Nachweis von pathologischen Aggregaten des Prionproteins im Liquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten wurde die Zahl der markierten Aggregate zunächst direkt aus der Zahl der Signalspitzen in der Intensitätsspur

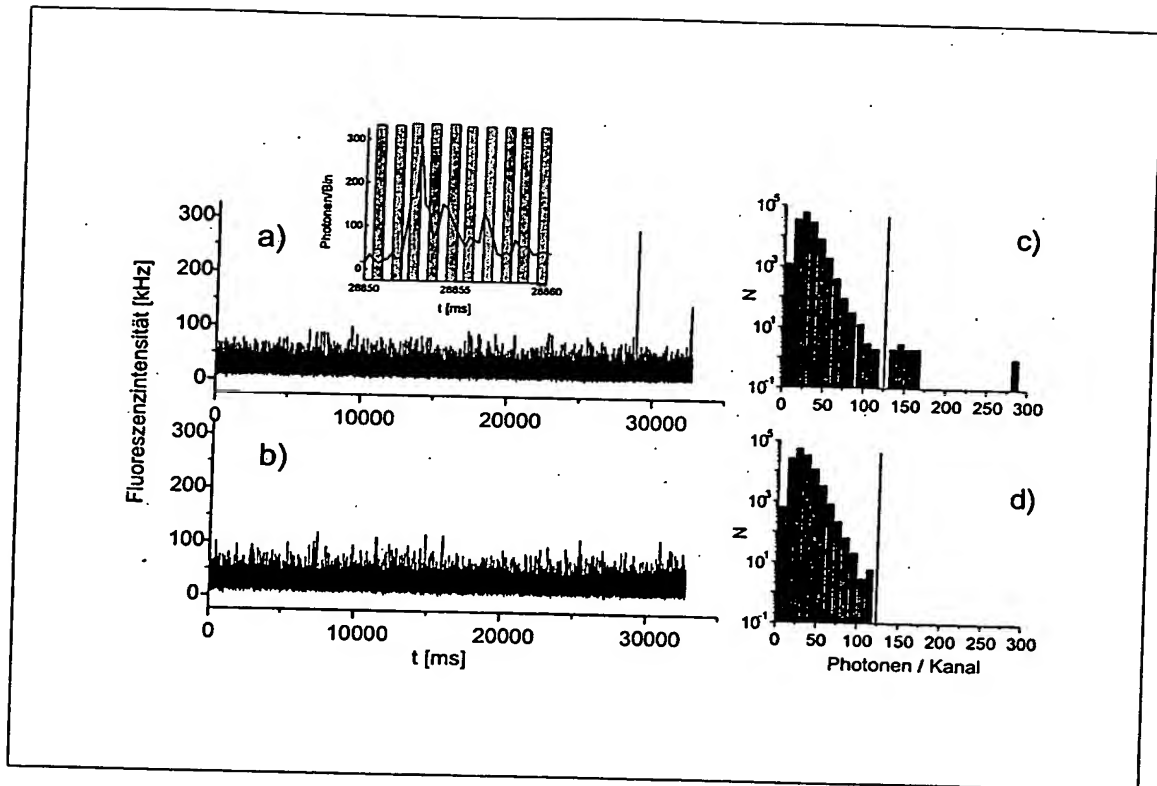
des Fluoreszenzsignals bestimmt. Als Sonde wurde hier solubilisiertes Prionprotein verwendet, das aus dem Hirnmaterial von Scrapie-infizierten Hamstern stammte. Die PrP-Sonde war mit dem Fluorophor Cy2 markiert. Abbildung 4.11 zeigt einen Ausschnitt der Spur des Fluoreszenzsignals einer Messung des Liquors eines Creutzfeldt-Jakob Patienten im Einkanal-FCS-Aufbau. Das Fluoreszenzsignal wurde durch die Software des FCS Geräts und parallel durch eine Mehrkanal-Zähler (MCS)-Karte aufgezeichnet. Zu erkennen sind mehrere Fluoreszenzspitzen, die den Durchtritt eines hochmarkierten Makromoleküls durch den Messfokus anzeigen. Zur Detektion demenzspezifischer Aggregate des A $\beta$ -Peptids im Spinalliquor von Alzheimerpatienten ist eine erfolgreiche Anwendung dieses Verfahrens beschrieben [92]. Im vorliegenden System ließ die geringe Zahl von Ereignissen und sondeninhärente Aggregate keine reproduzierbare Unterscheidung der Liquorproben von CJD Patienten und Kontrollpatienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu.

### Quantitative Intensitätsanalyse

Die direkte Zählung von Peaks im Fluoreszenzsignal erlaubt ohne eine Quantifizierung eines Schwellwertes der Intensität keine verlässliche Identifizierung markierter Zielmoleküle. Daher wurde eine einfache Form der Intensitätsanalyse entwickelt, die den Anteil an Fluoreszenzsignal hoher Intensität in einem Intensitätshistogramm darstellt, um so den Anteil des Peaksignals quantitativ zu bestimmen. Zu diesem Zweck wird das Signal des Photodetektors geteilt und die Fluoreszenzphotonen parallel zur Korrelationsanalyse in einer Zähler-Timer-Karte in Intervallen gleicher Länge (Bins) aufsummiert. Die Zahl der Zeitintervalle mit einer bestimmten Anzahl an detektierten Fluoreszenzphotonen wird im Laufe der Messung *on-line* in einem Intensitätshistogramm dargestellt.

Die Intensitätsverteilung der freien Sondenmoleküle (Abb. 4.13 b) ist durch die homogene mittlere Diffusionszeit der Sondenmoleküle und die Zahl an Fluorophoren wohl definiert. Lagen in der Lösung neben freien Sonden auch Zielmoleküle vor, die eine große Zahl fluoreszenter Sonden gebunden hatten, so zeigte das Intensitätshistogramm einen Anteil von Messkanälen mit einer hohen Zahl detektierter Fluoreszenzphotonen (Abb. 4.13 d).

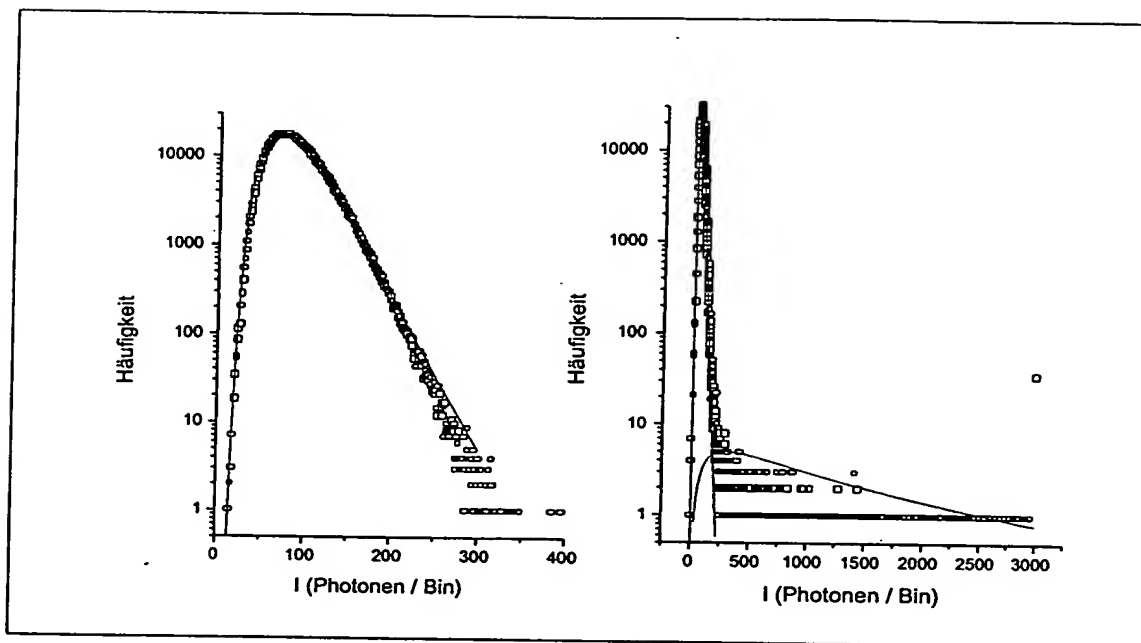
Die Verteilung der Fluoreszenzintensität entsteht durch die Konvolution der Fluktuation der Molekülzahl mit der Anregungs- und Detektionscharakteristik des Mes-



Figur 4.13: Quantitative Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals. a) Fluoreszenzspur der freien Sonde (rPrP-Cy2), b) Intensitätshistogramm des Fluoreszenzsignals a), c) Fluoreszenzspur Sonde + PrP-Aggregate, d) Intensitätshistogramm von c), Binweite 250  $\mu$ s.

saufbaus, der sogenannten *collection efficiency function* (CEF) (s. Kap. 2.7) [100]. Experimentell ließ sich die Intensitätsverteilung der Antikörper (3F4-Alexa488, s. Kap. 4.2.5) gut durch eine Log-Normalverteilung anpassen (Abb. 4.14 a).

Die Komponente der markierten Aggregate war aufgrund der heterogenen Aggregatgröße weniger gut definiert. Wie Abbildung 4.14 b) zeigt, ließ sie sich durch einen einzelnen Verteilungsterm nur unvollkommen beschreiben. Sie könnte durch eine Überlagerung der Verteilungen für unterschiedliche Aggregatgrößen und Chromophorzahlen quantifiziert werden. Aufgrund des kleinen N der detektierten Aggregate erschien dies jedoch wenig praktikabel. Das Signal der Zielmoleküle wurde daher durch Setzen eines Schwellenwertes vom Signal der Sonden abgetrennt und quantifi-



Figur 4.14: Histogramm der Fluoreszenzintensität Binweite  $500 \mu\text{s}$ . a) Antikörper-sonde 3F4-Alexa488  $c = 6 \text{ nM}$  Anpassung durch Log-Normalverteilung (s. Gl. 2.37) mit  $\mu = 32$ ,  $\sigma = 16$ . b) *prion rods*  $c = 0.35 \text{ nM}$ , Anpassung durch einen Sondenterm mit  $\mu_1 = 30$  und einen zweiten Term mit  $\mu_2 = 200$ .

ziert. Durch dieses Verfahren geht ein Teil des Signals der Zielmoleküle verloren, da es mit der Verteilung der Sondenmoleküle überlappt. Je höher der Schwellenwert, desto höher ist naturgemäß der Anteil an Zielmolekülen, deren Signal unterhalb der Schwelle liegt und die daher nicht detektiert werden. In der Regel wird zur Abtrennung eines Rauschhintergrundes eine Schwelle von  $3 \sigma$  gewählt [5]. Da im vorliegenden Fall die Sondenmoleküle gegenüber dem Target in einem Überschuss von bis zu  $10^6$  vorlagen und dennoch eine falsch positive Zuordnung des Signals vermieden werden sollte, wurde ein wesentlich konservativerer Schwellenwert gewählt, der typischerweise bei  $12 \sigma$  für die Detektion und bei  $8 \sigma$  für die Charakterisierung von Aggregaten lag.

Die Trennung des Signals von Sonden- und Zielmolekülen im Intensitätshistogramm hängt von der zeitlichen Auflösung, d.h. der Binweite, ab. Für eine maximale Trennung vom Sonden-hintergrund sollten die gesamten Photonen des Durchtritts

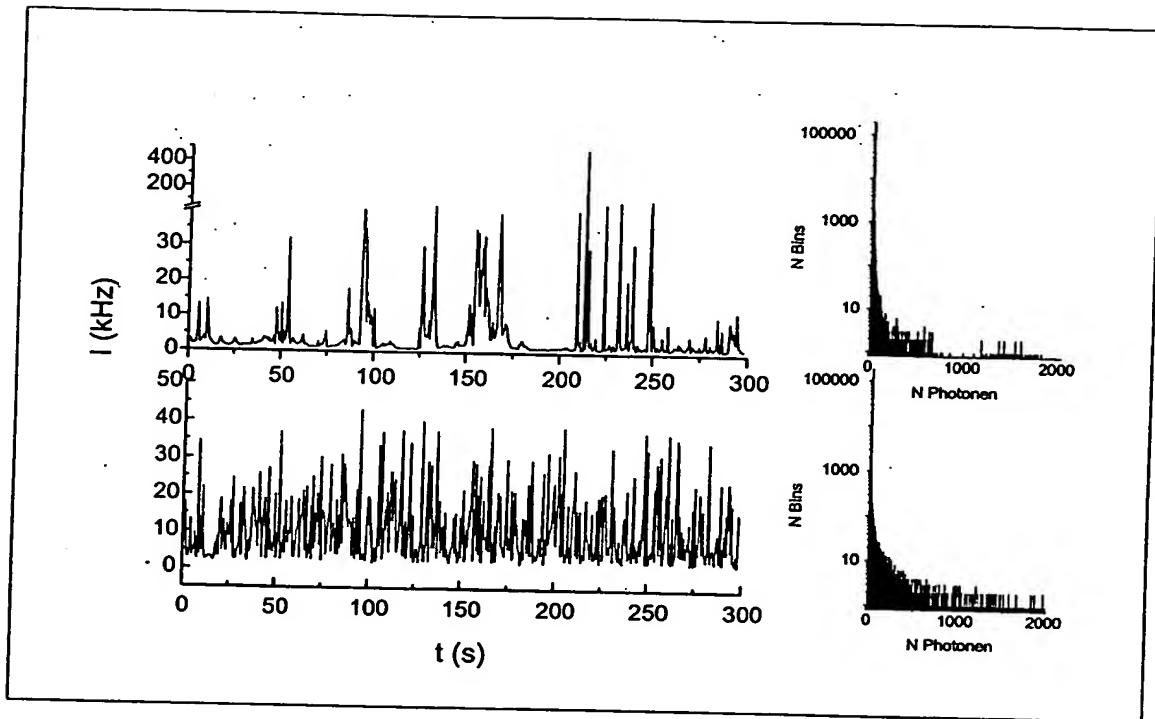
eines Zielmoleküls in ein Bin fallen. Dies ist somit die minimale zeitliche Auflösung der Detektion. Ist die Binweite größer als die mittlere Aufenthaltsdauer, so verringert sich das S/N-Verhältnis durch Mittelung über den Sonden hintergrund. Verteilt sich der Moleküldurchtritt auf zu viele Bins, nimmt die relative Fluktuation des Sondersignals zu und verringert so das Signal-Rausch-Verhältnis. Im Falle diffusionskontrollierter Bewegung bestimmt sich die mittlere Aufenthaltsdauer im konfokalen Volumenelement nach Gleichung 2.30 [36]. Sie beträgt etwa das Vierfache der mittleren Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$ . Im Falle reinen Flusses ist sie durch das Verhältnis von Fokaldurchmesser und Flussgeschwindigkeit bestimmt (s. Gl. 2.28). Für die Messung mit bewegter Probe wurde daher für eine Bewegungsgeschwindigkeit  $V = 1 \text{ mm/s}$  und für einen Fokalradius  $\omega_0 = 0.5 \mu\text{m}$  eine Binweite von  $0.5 \text{ ms}$  gewählt, so dass sich das Signal eines Zielmoleküls auf 1-2 Bins verteilt.

### Sensitivitätssteigerung durch Bewegung des Messvolumens

Während die Intensitätsanalyse eine einfache Separierung und Quantifizierung des Signals der Zielmoleküle erlaubt, steigert sie nicht die Zahl der Moleküldurchtritte und damit die Sensitivität der Detektion. Sie liefert jedoch, ebenso wie die Kreuzkorrelationsanalyse, einen Parameter zur direkten Unterscheidung von gebundenen und ungebundenen Sondenmolekülen, so dass die Größeninformation, die die Diffusionszeit liefert, nicht länger zur Erkennung der Zielmoleküle erforderlich ist. Diese können auch dann erkannt werden, wenn die Probe während der Messung relativ zum Messfokus bewegt wird.

Durch „Scannen“ der Probe wurde die Diffusionsbewegung der Moleküle von einer ‘Flussbewegung’ überlagert. Für Moleküle, deren diffusionsbedingte Eintrittsfrequenz in das Volumenelement klein gegenüber ihrer Aufenthaltsdauer im Messvolumen ist, kann die Detektionsempfindlichkeit durch Vergrößerung des Messvolumens, d.h. durch „Scannen“ der Probe, entscheidend erhöht werden (vgl. Kap. 2.5.5).

Im Gegensatz zur stationären Messung, bei der die Messlösung in der Regel als Tropfen auf einem Deckglas ruhte, wurde die Probenlösung für die Messung mit bewegtem Volumenelement in eine gezogene Glaskapillare gefüllt, die ein Volumen von  $20 \mu\text{l}$  umschloss. Die versiegelte Messkapillare wurde während der Messung



Figur 4.15: Einfluss der Probenbewegung auf die Anzahl der detektierten Ereignisse. Intensitätsspur und Intensitätshistogramm von fluoreszenten Polystyrolbeads in PBS + 0.1%(w/v) NP40 bei Anregung mit 488 nm. *oben*: Messung ohne Bewegung, *unten*: mit Bewegung der Messkapillare mit 1mm/s. Die Zahl der detektierten Ereignisse steigt etwa 100 fach. *rechts*: Intensitätshistogramm beider Messungen. Durch Bewegung der Probe steigt die Zahl der Kanäle mit einer Intensität  $> 500$  Photonen/Kanal vierfach.

mäanderförmig mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s bewegt und damit das Probenvolumen durchscannt. Die Durchtrittszeit der Aggregate durch das Messvolumen verringerte sich durch das „Scannen“ der Probe von 3 – 50 ms auf  $\sim 0.5$  ms. Die Durchtrittszeit wurde daher allein durch die Flussgeschwindigkeit und durch die Geometrie des Messvolumens bestimmt (s. Kap. 2.5.4). Damit wurde auch die Zahl der Messkanäle mit einem Signal hoher Intensität proportional zur Zahl der markierten Partikel, die durch das Messvolumen traten.

Durch die geringe Zahl an Ereignissen in der stationären Messung ließ sich der Gewinn an Sensitivität durch die Probenbewegung nicht direkt am diagnostischen System messen, da in der Regel in der stationären Probe wenige oder keine Ag-

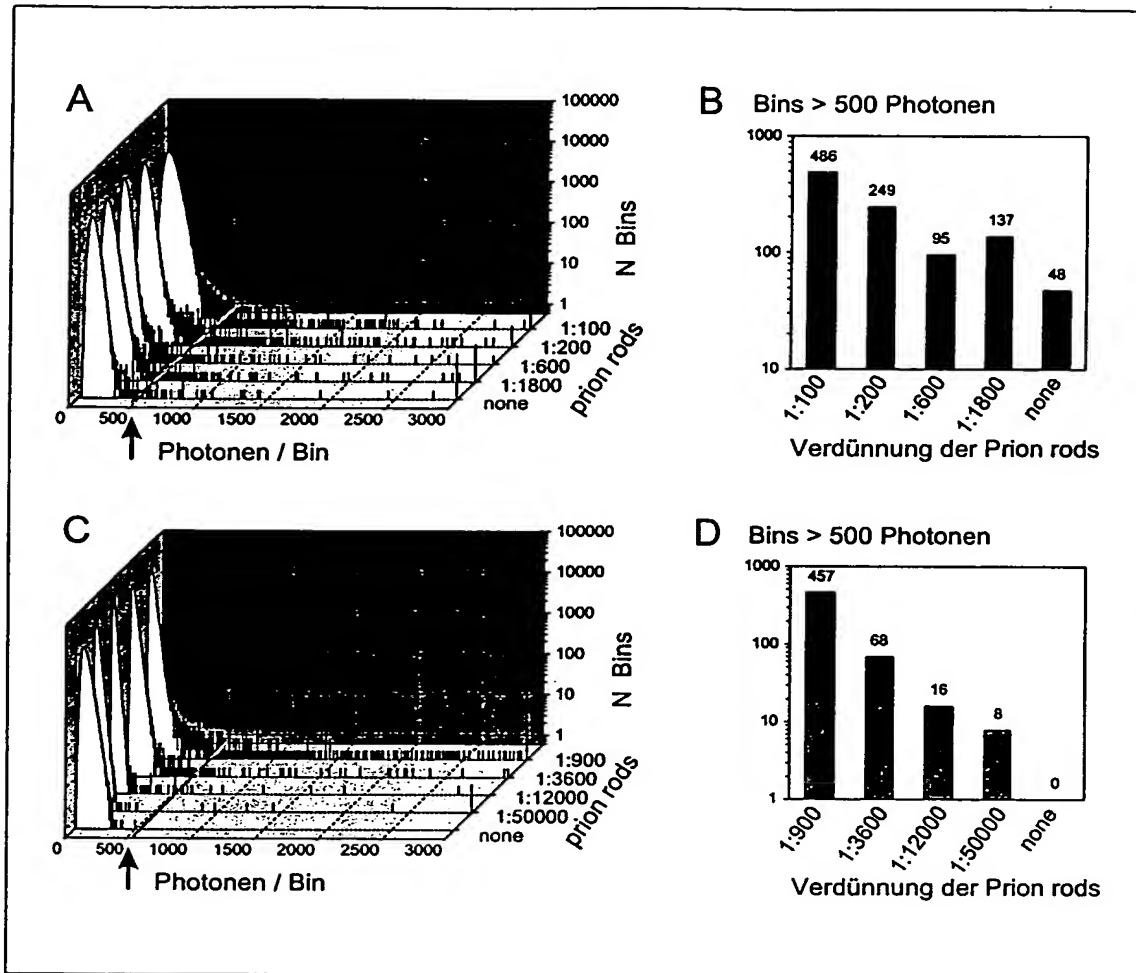


gregate detektiert wurden. Um die Steigerung der Durchtrittsfrequenz durch das „Scannen“ der Probe zu bestimmen, dienten fluoreszente Polystyrolperlen, sogenannte Beads, mit einem Durchmesser von  $0.1 \mu\text{m}$  als Modell für die Aggregate. Die mittlere Diffusionszeit der Beads entsprach mit ca. 3 ms der unteren Grenze der Diffusionszeiten, die für die PrP-Aggregate bestimmt worden waren. In der bewegten Messung (Abb. 4.15) wurden etwa 100-fach mehr Ereignisse detektiert als in der stationären Messung.

Die Zahl der detektierten Ereignisse steigt mit der Geschwindigkeit, mit der die Probe bewegt wird. Wenn die diffusionbedingte Bewegung vernachlässigt wird, ist die Zahl der detektierten Ereignisse proportional zum durchmessenen Volumen. Bei der Detektion von pathogenen PrP<sup>Sc</sup>-Aggregaten erhöhte eine Steigerung der Scangeschwindigkeit von 1 mm/s auf 5 mm/s die Zahl der Ereignisse und damit die Sensitivität um den Faktor drei. Die Art der Ansteuerung des Positioniertisches begrenzte im Routineeinsatz jedoch die Bewegung auf 1 mm/s.

### Evaluation des SIFT-Verfahrens mit PrP und Antikörpersonden

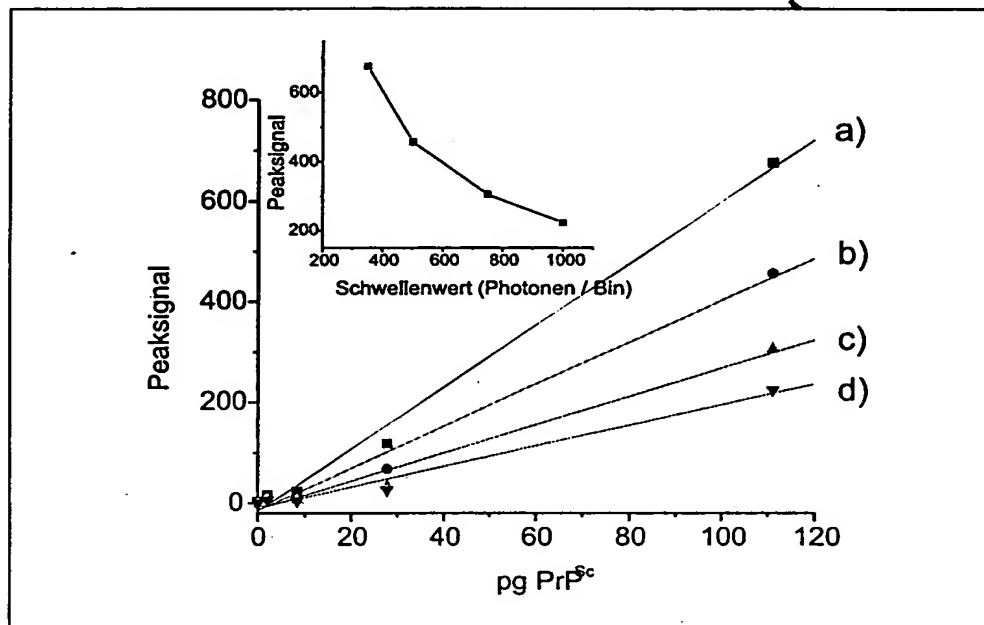
Die Kombination der Intensitätsanalyse mit einer Probenbewegung, d.h. die „Suche nach intensiv fluoreszierenden Targetmolekülen“ (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*, SIFT), wurde hinsichtlich ihrer Detektionssensitivität an einem Modellsystem untersucht. Aufgereinigte Aggregate des pathogenen Prionproteins, die aus dem Hirngewebe des syrischen Hamsters gewonnen wurden, sogenannte *prion-rods*, wurden in Spinalliquor verdünnt. Zur Detektion wurde einerseits fluoreszenzmarkiertes rekombinantes Hamster-PrP und andererseits ein markierter PrP-spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde in einem Intensitäts-histogramm ausgewertet (s. Abb. 4.16 A,C) und die Anzahl der Kanäle mit einer Intensität oberhalb einer Schwelle von 500 Photonen/Kanal addiert (s. Abb. 4.16 B,D). Abhängig von der Konzentration der *prion-rods* wurde ein hochintensives Signal erhalten. Die PrP-Sonde zeigte jedoch bereits ohne Zugabe von Zielmolekülen einen Anteil an Signal hoher Intensität, vor dessen Hintergrund die *prion-rods* nur bis zu einer Verdünnung von etwa 1:500 nachzuweisen waren. Das sondeninherente Signal, das in den stationären Messungen durch deren geringere Sensitivität nicht



**Figur 4.16:** Evaluierung unterschiedlicher Sondenmoleküle. Hamster rPrP(90-231), markiert mit Oregon Green, (A, B) und monoklonaler Antikörper 3F4, markiert mit Alexa 488, (C, D) wurden zu Liquor von Kontrollpatienten zugegeben, der mit *prion rods* versetzt wurde. Die Messung erfolgt 600 s mit einer Probenbewegung von 1mm/s und einer Kanalweite von 500  $\mu$ s. Das Signal hoher Intensität wurde mit einer Schwelle (s. Pfeil) von 500 Photonen/Bin abgetrennt (B, D).

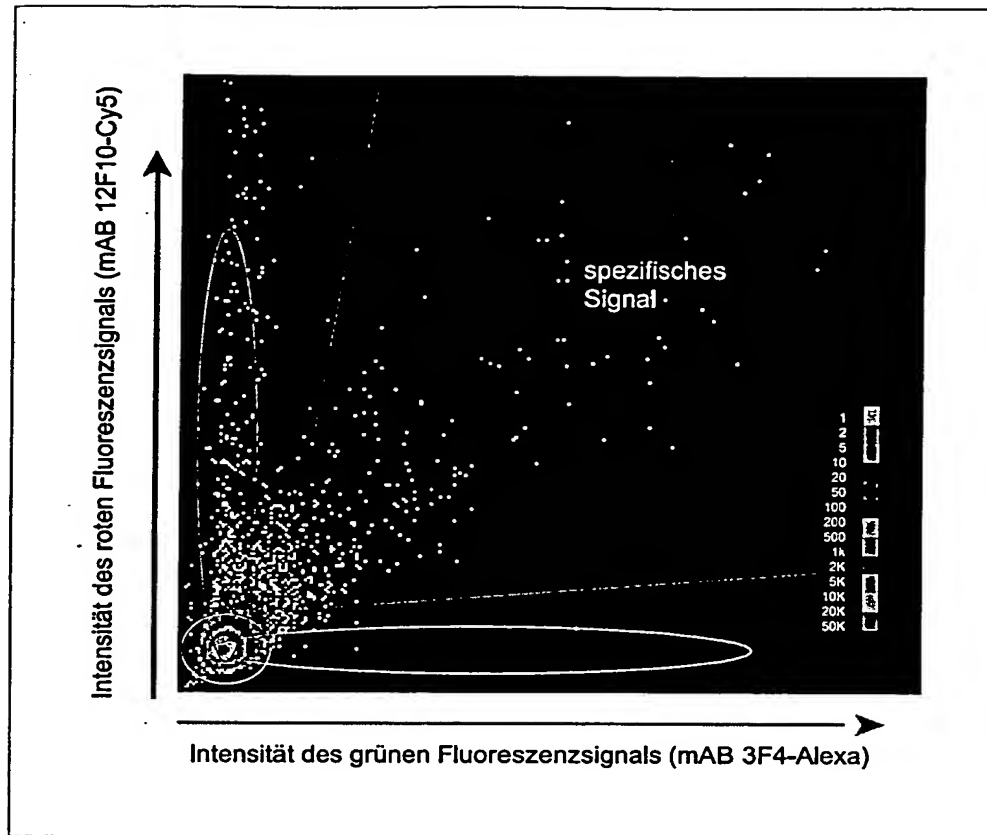
zu beobachten war, ist durch Aggregate der PrP-Sondenmoleküle bedingt. Diese können durch zwei Prozesse entstehen: einerseits durch die Selbstaggregation des PrP, die in Kap. 4 beschrieben ist, und andererseits durch die Entstehung hochmolekularer Aggregate beim Markieren des PrP mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Die

Aggregatbildung bei der Markierung ließ sich trotz sorgfältiger Wahl der Reaktionsbedingungen nicht vollständig unterdrücken. Multimere PrP-Aggregate sind in der bewegten Probe erheblich empfindlicher nachzuweisen, als dies in den Messungen zur Selbstaggregation der Fall war. Dagegen war die Antikörpersonde weitgehend frei von inhärentem Signal, so dass durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers die Detektionsschwelle um zwei Größenordnungen gesenkt werden konnte.



Figur 4.17: Peak signal der *prion rods* aus Abb. 4.16 C in Abhängigkeit von der Konzentration der Zielmoleküle bei einer Schwelle von a) 350, b) 500, c) 750, d) 1000 Photonen/Bin. Die Detektionsgrenze beträgt 2 pg. *Einsatz*: Peak signal von 110 pg PrP<sup>Sc</sup> in Abhängigkeit vom Schwellenwert.

Abbildung 4.17 zeigt das SIFT-Signal in Abhängigkeit von der *prion-rod* Konzentration bei verschiedenen Schwellenwerten. Während sich die Zahl der Kanäle hoher Intensität in Abhängigkeit vom Schwellenwert änderte, hatte die Wahl des Schwellenwertes keinen Einfluss auf die Proportionalität des SIFT-Signals zur Konzentration an *prion rods*.



Figur 4.18: Prinzip der Zweikanal-Intensitätsanalyse. Rot und grün markierte Antikörper (3F4-Alexa 488,  $c = 5 \text{ nM}$ , 12F10-Cy5,  $c = 6 \text{ nM}$ ) wurden zu Liquor von Kontrollpatienten zugegeben, der mit *prion rods* versetzt wurde (1:500). Die Messung erfolgt 600 s mit einer Probenbewegung von  $1 \text{ mm/s}$  und einer Kanalweite von  $500 \text{ }\mu\text{s}$ . Das koinzidente Signal hoher Intensität wird mit einer progressiven Schwelle vom Signal der freien Sonden und hochintenssem Signal der Einzelkanäle abgetrennt. Jeder Punkt entspricht einem Intensitätspaar. Die Zahl der Messkanäle ist logarithmisch auf einer Farbskala dargestellt.

## Zweidimensionale Intensitätsanalyse

Um die Spezifität der Detektion zu erhöhen, wurde das Detektionssystem um eine zweite Sonde erweitert, die gegen ein anderes Epitop des Prionproteins gerichtet ist. Diese wurde mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markiert, der im roten Spektralbereich bei  $633 \text{ nm}$  angeregt werden kann. Bei Bindung der Sonden resultieren Zielmoleküle, die eine hohe Zahl beider Farbstoffe tragen. Dadurch können zwei Pa-

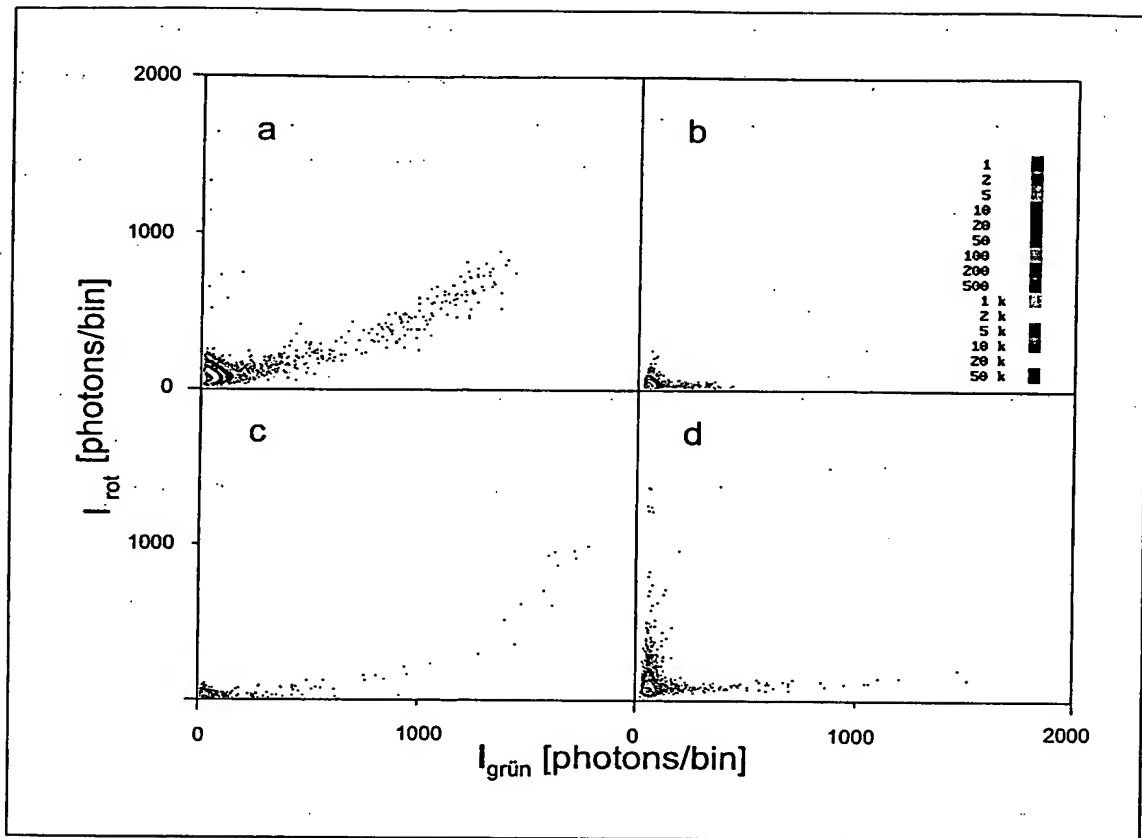
parameter zur Isolierung des Signals der Zielmoleküle genutzt werden: 1. die Amplitude der Zweifarben-Kreuzkorrelation und 2. die simultane Fluoreszenzintensität.

Wird das Fluoreszenzsignal mit hoher zeitlicher Auflösung betrachtet, so kann der Durchtritt eines doppelt markierten Aggregats durch eine Spitze im Fluoreszenzsignal identifiziert werden, die gleichzeitig in beiden Messkanälen auftritt. Für eine Intensitätsanalyse beider Detektionskanäle wurde das Fluoreszenzsignal beider Kanäle in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm aufgetragen. Analog zur Intensitätsanalyse eines Messkanals wurden die Fluoreszenzphotonen parallel in zwei Kanälen in Bins von 500  $\mu\text{s}$  gezählt und die Intervalle entsprechend der Zahl der detektierten Photonen in einem zweidimensionalen Feld aufsummiert. Im Intensitätshistogramm, das während der Messung *on-line* dargestellt werden kann, ist die Fluoreszenzintensität der beiden Farben auf den Achsen aufgetragen, die Zahl der Bins eines Intensitätspaares ist durch die Farbe des jeweiligen Punktes logarithmisch dargestellt. Abbildung 4.18 zeigt das Intensitätshistogramm einer Messung von *prion rods*, überlagert mit einer schematischen Darstellung der Signalbereiche.

Durch diese Auswertung wird das Signal von Partikeln, die gleichzeitig ein Signal hoher Intensität sowohl im grünen als auch im roten Detektionskanal zeigen, vom Signal der freien Probe separiert. Das aggregatspezifische Signal liegt im vierten Quadranten des Histogramms, während die überwiegende Zahl der Bins die kombinierte Signalverteilung der beiden freien Sonden wiedergibt und somit im ersten Quadranten liegt (s. Abb. 4.18, grau umrandet). Wiederum wird das hochintense Signal im einfachsten Fall über einen Schwellenwert separiert. Um dem Übersprechen der Detektionskanäle Rechnung zu tragen, wurde ein progressiver Schwellenwert gewählt. Wird in einem Bin ein Signal hoher Intensität in einem der Kanäle detektiert, steigt der Schwellenwert zur Abtrennung des spezifischen Signals im anderen Kanal (s. Abb. 4.18, grüne Linien). Dies ist streng genommen nur zur Abgrenzung des spezifischen Signals von grünem unspezifischen Signal hoher Intensität erforderlich. Das Emissionsspektrum des grünen Farbstoffs überlappt zu einem kleinen Teil mit dem Emissionsspektrum des roten Fluorophors. Etwa 0.5 % der Photonen, die ein Molekül, das nur grüne Fluorophore trägt, beim Durchtritt durch den Fokus emittiert, werden daher vom roten Detektor aufgefangen.

Durch die gleichzeitige Markierung mit zwei Typen von Sondenmolekülen konnte die Spezifität der Detektion erhöht werden. Beide Sonden, die gegen unterschiedli-

che Epitope des Zielmoleküls gerichtet waren, banden unabhängig voneinander an das Aggregat. Gleichzeitig erfolgte zum Teil eine unspezifische Bindung der Sonden an zelluläre Bestandteile in der Probenlösung sowie eine Bindung durch sekundäre Proteine, z. B. Sekundärantikörper, die in der biologischen Probe vorlagen. Diese Prozesse führten zur Bildung intensiv fluoreszierender Partikel. In der Messung, die in Abbildung 4.18 dargestellt ist, war dies für die rot markierte Antikörpersonde der Fall. Ob derartige unspezifische Aggregate in einem oder beiden Kanälen auftraten, hing jedoch von der untersuchten Probe sowie von anderen schwer zu kontrollierenden Faktoren wie der Präparation der Antikörper ab. Dieses Signal, das nur in einem der Messkanäle auftritt (s. Abb. 4.18, rote und grüne Elipse), kann in der Zweifarben-Intensitätsanalyse ebenfalls vom spezifischen Signal separiert werden.



Figur 4.19: Spezifität der Detektion von  $A\beta$  und PrP Zielmolekülen durch Zweikanal-SIFT. Es wurden spezifische und unspezifische Paare von Sonden und Zielmolekülen kombiniert: a) voraggregiertes  $A\beta(1-42)$ -Peptid ( $1\mu M$ ) +  $A\beta$ -Antikörper (6E10-Cy5, p42-Alexa), b)  $A\beta(1-42)$ -Peptid ( $1\mu M$ ) + PrP-Antikörper (3F4-Alexa, 12F10-Cy5), c) *prion rods* 1:1000 + PrP-Antikörper (3F4-Alexa, 12F10-Cy5), d) c) *prion rods* 1:1000 + irrelevante Antikörper (Anti-IL8-Oregon Green, Anti- $A\beta$ -Cy5.)

### Evaluierung von Spezifität und Sensitivität

Das erweiterte Detektionssystem wurde wiederum hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität der Detektion am diagnostischen Modellsystem evaluiert. Dazu diente Liquor von Kontrollpatienten, der mit *prion-rods* versetzt wurde.

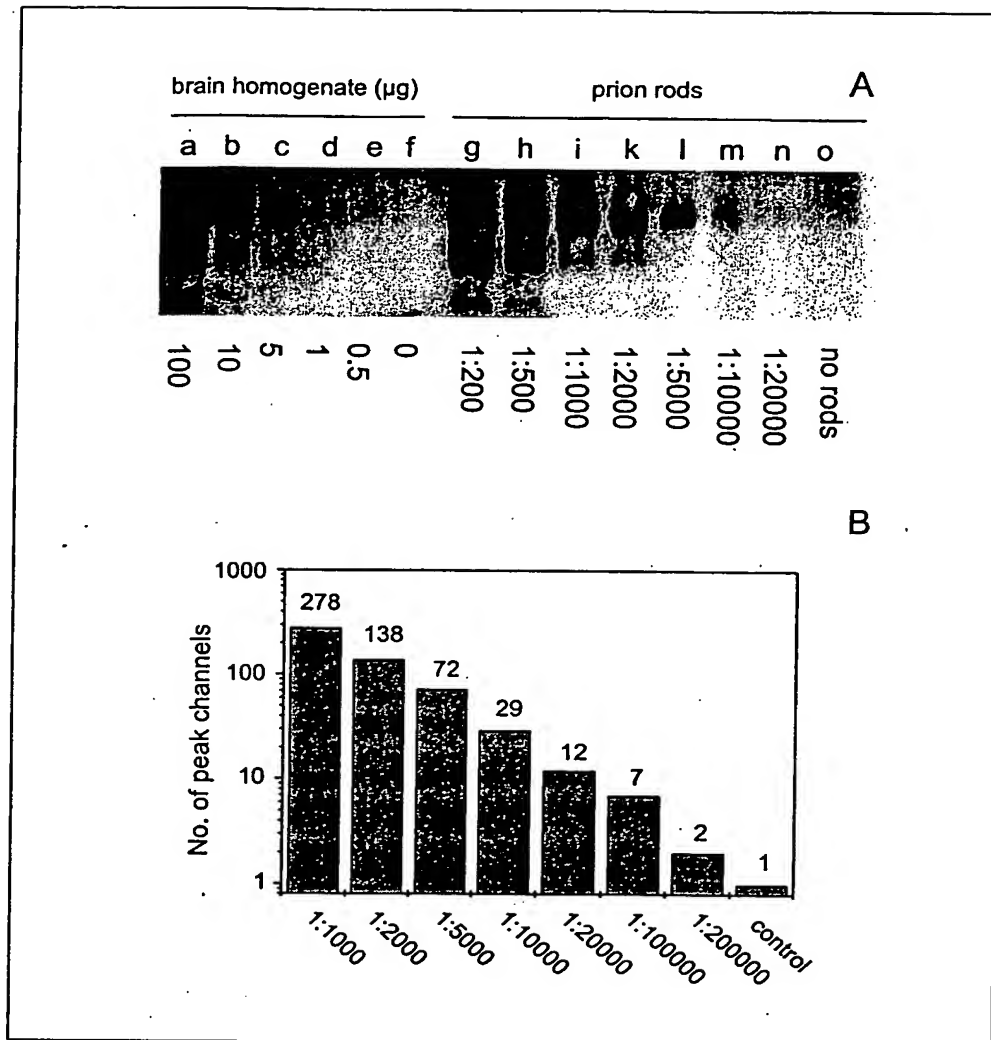
Die Spezifität der Erkennung des Zielmoleküls wurde anhand von spezifischen und unspezifischen Sonden sowie spezifischen und unspezifischen Zielmolekülen un-

tersucht (s. Abb. 4.19). Als spezifische Sonden wurden jeweils zwei monoklonale Antikörper verwendet. Ohne die Zugabe von *prion-rods* wurde fast kein gleichzeitiges Signal hoher Intensität beobachtet (s. Abb. 4.21). Nach Zugabe von aggregiertem  $A\beta(1-42)$  Peptid als unspezifisches Zielmolekül wurden ebenfalls keine doppelt markierten Aggregate beobachtet, wenn auch ein Antikörper (3F4) unspezifisches Signal zeigte (Abb. 4.21 b). Dagegen trat bei Zugabe von spezifischen Sonden – 3F4 und 12F10 zu PrP-Zielmolekülen sowie 6E10 und pAB42 zu  $A\beta(1-42)$  Peptid – ein starkes Signal doppelt markierter Zielmoleküle (Abb. 4.21 a,c) auf. Um zu testen, ob zwei unspezifische Sonden gleichzeitig an ein einzelnes Zielmolekül binden, wurden zwei Sonden gegen die Zielmoleküle IL8 und  $A\beta(1-40)$ , die nicht mit der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung assoziiert sind, zu Kontrollliquor zugegeben, der *prion-rods* enthielt. Obwohl ein Signalanteil hoher Intensität in beiden Kanälen auftrat, der durch Bindung oder Aggregation der Sonden entstanden sein kann, wurde kein hochintensives Signal beobachtet, das simultan in beiden Kanälen auftrat (Abb. 4.21 d).

Die Sensitivität des Detektionssystems wurde mit dem Nachweis von Prionprotein durch *Western Blot* nach Verdau mit Proteinase K verglichen. Auf diesem Verfahren beruhen praktisch alle derzeitigen Test auf pathogenes Prionprotein. Aliquots des in Liquor verdünnten *prion-rod* Materials wurden parallel durch *Western Blot* analysiert und in einem FCS-Aufbau vermessen, wobei das Signal durch SIFT und Kreuzkorrelationsanalyse ausgewertet wurde (s. Abb. 4.20). Abbildung 4.21 zeigt die Intensitätshistogramme bei unterschiedlicher Konzentration. Die Konzentration der *prion-rods* konnte durch Zweikanal-Intensitätsanalyse über vier Größenordnungen gemessen werden, wobei die Detektionsschwelle bei einer Verdünnung von  $1:2 \cdot 10^5$  lag. Die Detektionsschwelle des *Western Blots* lag dagegen bei  $1:10^4$ . Das Signal des *Western Blot* wurde anhand der Bandenintensität geldensitometrisch quantifiziert. Durch Vergleich mit dem parallel aufgetragenen Hirngewebe eines Scrapie-infizierten Hamsters wurde ermittelt, dass die Nachweisgrenze des Blots etwa  $1 \mu\text{g}$  Hirngewebe entsprach. Diese Menge Gewebe enthält etwa  $10 \text{ pg}$  monomeren  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  [96], was bei der aufgetragenen Menge von  $20 \mu\text{l}$  einer Konzentration von  $33 \text{ pM}$  entspricht. Dementsprechend war das Detektionslimit der SIFT-Messung, bei dem in der Messzeit von  $600 \text{ s}$  noch ein bis zwei Aggregate detektiert wurden,  $0.5 \text{ pg}$  bzw.  $2 \text{ pM}$   $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

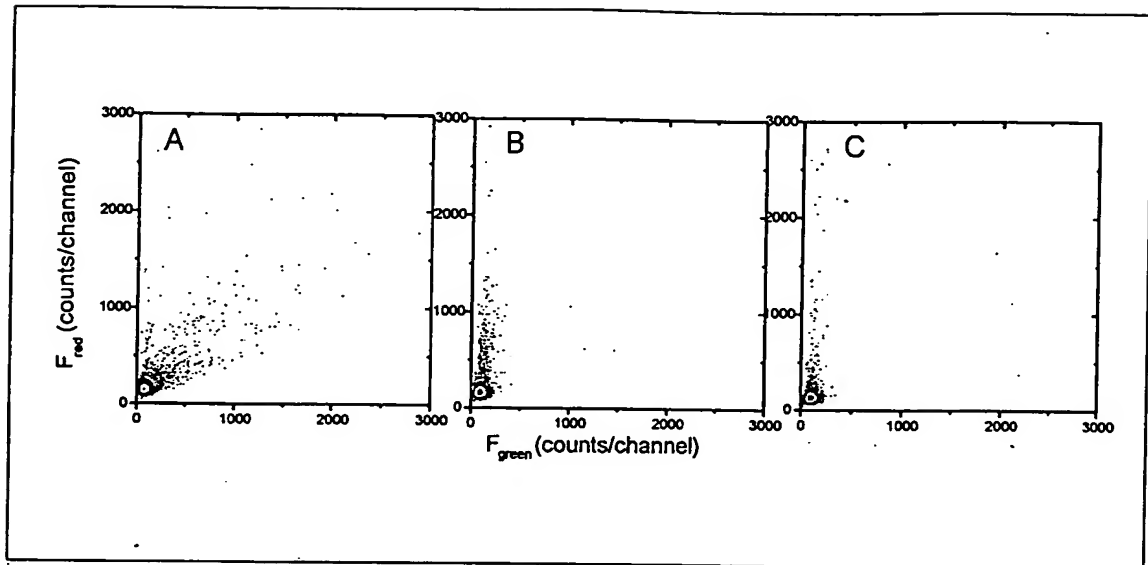
Die physikalische Detektionsschwelle der Messung ist die Detektion eines einzel-





Figur 4.20: Western Blot und Zweikanal-SIFT Messung einer Verdünnungs von *prion rods* in Spinalliquor. Das Hirnhomogenat eines scrapie-infizierten Hamsters 263K (a-f) und *prion rods* in Liquor wurden wie angegeben verdünnt. A: PrP<sup>Sc</sup> wurde mit Proteinase K (100 µg/ml) 30 min bei 37°C verdaut und anschließend durch Western Blot mit dem Antikörper 3F4 nachgewiesen. B: Parallel wurden Aliquots der *prion rods* durch Zweikanal-SIFT gemessen und das Signal wie in Abb. 4.18 beschrieben ausgewertet.

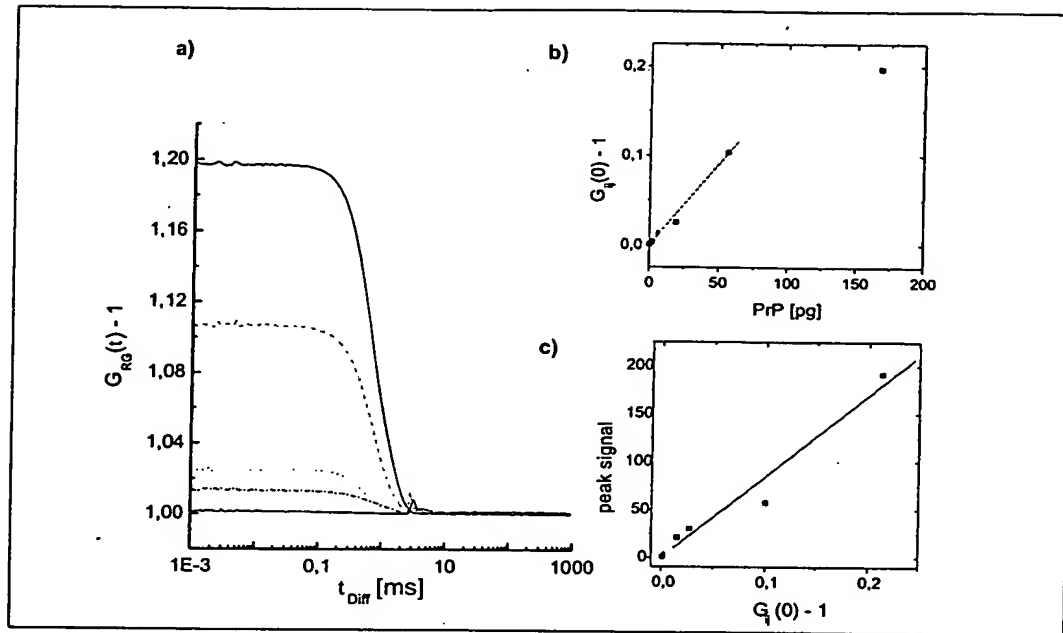
nen Partikels im durchmessenen Volumen. Bei einem Scanvolumen von ca.  $2 \cdot 10^6$  Fokalvolumina des konfokalen Aufbaus (vgl. Kap. 2.5.5) entspricht dies einer Kon-



Figur 4.21: Histogrammdarstellung der Zweikanal-SIFT Messung einer Verdünnung von *prion rods* in Spinalliquor. A: Verdünnung 1:2000, B: 1:10<sup>5</sup>, C: ohne PrP<sup>Sc</sup>.

zentration von 1 fM, wenn man Verzerrungen des Volumenelementes vernachlässigt. Die Aggregatkonzentration, die sich aus der SIFT Messung durch Überlegungen zur Detektionsschwelle ergibt, lässt sich ins Verhältnis zur Konzentration des monomeren PrP setzen, die im *Western Blot* bestimmt wurde. Dies führt zu einer mittleren Aggregatgröße von ca. 1000 PrP Molekülen.

Die Sensitivität im Nachweis von pathologischen amyloiden Aggregaten der Alzheimer Demenz, deren Hauptkomponente A $\beta$ -Peptide mit einer Länge von 40–43 Aminosäuren sind, wurde in analoger Weise an A $\beta$  (1–42) Peptid untersucht, das zuvor unter kontrollierten Bedingungen aggregiert worden war. Als fluoreszente Sonden dienten zwei Antikörper, von denen einer spezifisch die C-terminalen Aminosäuren des A $\beta$ 42, der andere dagegen ein Epitop in der Konsensussequenz der A $\beta$  Peptide erkannte. Die A $\beta$ -Aggregate konnten bis zu einer Konzentration von 100 pM (9 pg) an monomeren A $\beta$ 42 detektiert werden. Dies lässt auf eine Aggregatgröße von etwa 10<sup>5</sup> Einheiten je Aggregat schließen.

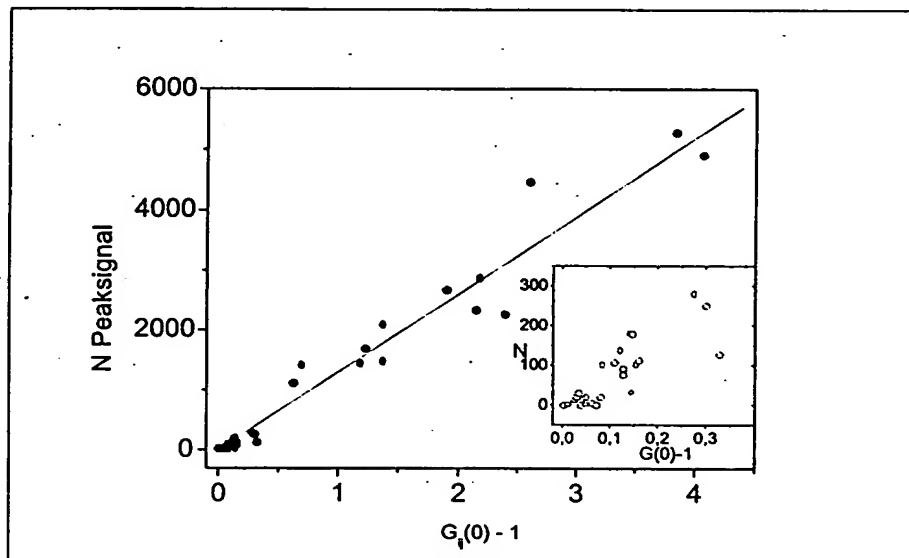


Figur 4.22: a) Kreuzkorrelationssignal einer Verdünnung von *prion rods* in Spinalliquor.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Konzentration: 160pM (Linie), 56pM (Striche), 20pM (Punkte), 6 pM (Strichpunkte), 2pM (kurze Striche), ohne Rods (dünne Linie). b) Auftragung Kreuzkorrelationsamplitude  $G_{ij}(0)$  gegen die eingesetzte Menge an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . c) Auftragung der Zahl der Messkanäle hoher Fluoreszenzintensität der Zweikanal-SIFT Analyse gegen die Kreuzkorrelationsamplitude  $G_{ij}(0)$ .

### Vergleich mit Kreuzkorrelationsanalyse

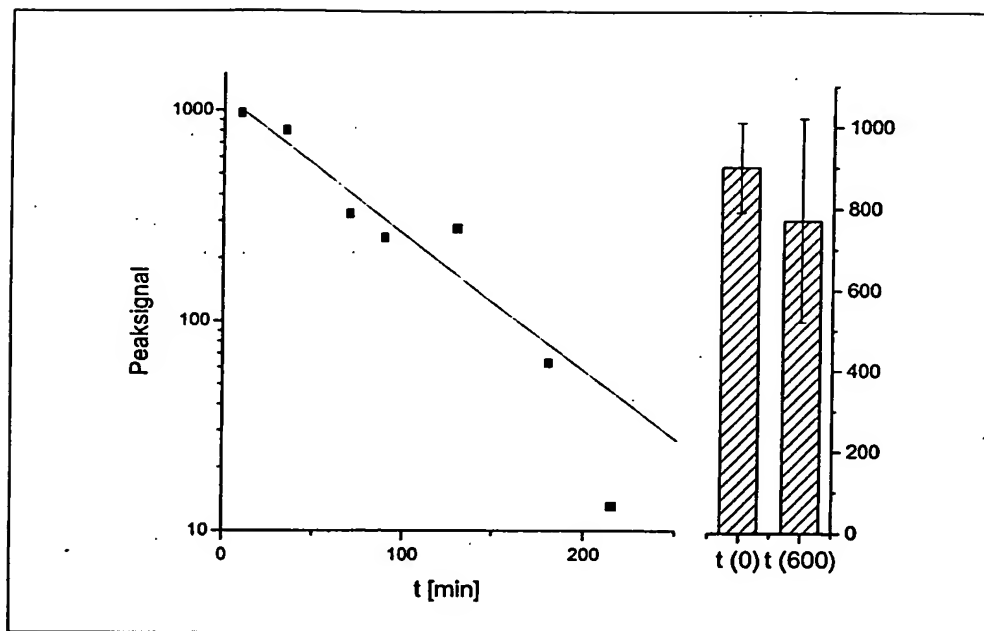
Parallel zu der Auswertung mittels SIFT wurde das Fluoreszenzsignal der Messungen durch Kreuzkorrelation der Detektionskanäle nach Gleichung 2.31 ausgewertet. Die Abbildung 4.22 zeigt die Kreuzkorrelationskurven einer Verdünnung von *prion rods* in Liquor. Im Bereich von 0 bis 50 pg  $\text{PrP}$  (160 pM) ist die Kreuzkorrelationsamplitude proportional zur Menge der eingesetzten *prion rods*. Bedingt durch die hohe Zahl der Fluorophore, die an ein Zielmolekül gebunden sind, lag die effektive Detektionsquantenausbeute (cpms), deren Maß die Zahl der eingesammelten Photonen je Molekül und Sekunde ist, mit bis zu 200 kHz um ein Vielfaches über dem Wert von 1-2 kHz, den doppelt markierte Oligomere in den Versuchen zur Selbstaggregation im Kreuzkorrelationssignal erreichten (vgl. Abb. 4.9). Die hohe

Moleküldetektionseffizienz bedingt ein hohes Signal/Rausch Verhältnis und damit eine hohe Kreuzkorrelationsamplitude. Die Kreuzkorrelationsamplitude war bis zu einer PrP Konzentration von 5 pM vom Signal der Kontrollprobe zu differenzieren. Durch die geringe Zahl der Ereignisse streute die Korrelationsamplitude bei niedrigen Konzentrationen stark.



Figur 4.23: Auftragung der Zahl der Messkanäle hoher Fluoreszenzintensität der Zweikanal-SIFT-Analyse gegen die Kreuzkorrelationsamplitude  $G_{ij}(0)$  von aggregiertem  $A\beta(1-42)$  Peptid in verschiedenen Medien. Die Messung erfolgte wie in Abb. 4.18 in Liquor und Puffer mit und ohne Detergenz (Puffer: PBS, PBS + 0.1% NP40, RIPA, PBS + 0.2 % SDS, Liquor, Liquor + 0.1% NP40) Als spezifische Antikörpersonden dienten pAB42-Alexa und 6E10-Cy5,  $c = 6$  nM. Unabhängig vom verwendeten Medium waren beide Signale proportional.

Innerhalb einer Messreihe waren beide Parameter,  $G_{ij}(0)$  und SIFT-Signal, zueinander proportional (s. Abb. 4.22 c). Damit beide Methoden als allgemeines Maß der Konzentration dienen können, ist es zudem erforderlich, dass beide Signale unabhängig von den Messbedingungen, wie Puffer und Detergenzienkonzentration, korrelieren. Abbildung 4.23 vergleicht am Modellsystem des aggregierten  $A\beta$ -Peptids das Verhältnis beider Signale unter einer Vielzahl von Pufferbedingungen. Es blieb für ein Sondenpaar bei konstanter Anregung gleich.



Figur 4.24: Zeitliche Entwicklung der detektierten Multimere von aggregiertem  $A\beta(1-42)$  Peptid. Die Messung erfolgte wie in Abb. 4.23 in PBS + 0.1% NP40. Der Effekt war in Liquor und Puffer mit verschiedenen Detergenzien zu beobachten (Puffer: PBS, PBS + 0.1% NP40, RIPA, PBS + 0.2 % SDS, Liquor, Liquor + 0.1% NP40). Balkendiagramm: Rückgewinnung der Zielmoleküle nach 600 min durch Aufschütteln im gemittelten Signal aus fünf Messreihen.

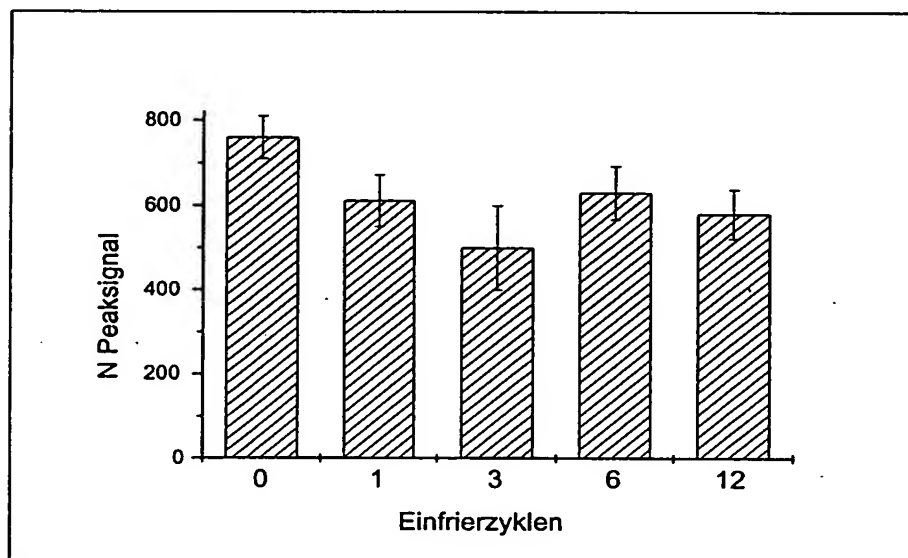
### Grenzen des SIFT-Verfahrens

Mehr noch als die physikalischen Grenzen eines Detektionsverfahrens begrenzen bei der Messung in einem biologischen Medium potentieller Störquellen die effektive Sensitivität. Der Nachweis pathologischer Aggregate wird vor allem durch zwei Effekte erschwert:

1. Die Ausdünnung der Zielmoleküle im Rahmen der Probenhandhabung durch Adsorptionseffekte und
2. unspezifische Bindung oder Aggregation der Sondenmoleküle, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Durch ihren hydrophoben Charakter neigen amyloidartige Aggregate besonders zur Adsorption an den Oberflächen der Probengefäße. Aus konventionellen Nachweisverfahren sind auch Verluste von PrP<sup>Sc</sup> durch Einfrieren der Probe beschrieben. Der Einfluss dieser Faktoren auf das spezifische Signal der Zweikanal-Intensitätsanalyse wurde anhand aggregierten A $\beta$ -Peptids in Liquor und Puffer sowie unter Zugabe verschiedener Detergenzien untersucht.

Sowohl im Probengefäß wie auch in der Messkapillare konnte in verdünnten Lösungen ein drastischer Verlust an spezifischem Signal beobachtet werden. Der Verlust an aggregatspezifischem Signal ließ sich in guter Näherung durch einen Exponentialterm mit einer Zeitkonstante von 60–70 min beschreiben. Es ist davon auszugehen, dass die Moleküle durch Sedimentation und Adsorption aus der Messlösung ausgedünnt werden. Ein Modell für die Ausdünnung wäre die irreversible Bindung an eine potentielle Bindungsstelle der Kapillarwand. Da diese Bindungsstellen gegenüber den Aggregaten in einem vielfachen Überschuss vorliegen, resultiert scheinbar eine Reaktion erster Ordnung.



Figur 4.25: Einfluss wiederholter Einfrierzyklen auf das Peaksignals von aggregiertem A $\beta$ (1–42) Peptid. Die Messung erfolgte wie in Abb. 4.23 im Liquor von Kontrollpatienten + 0.1% NP40. Aliquots der Zielmoleküle wurden in einem silanisierten Probengefäß auf Trockeneis schockgefroren und im Wasserbad (25°C) aufgetaut.

Der Adsorptionseffekt wurde auch unter Zusatz verschiedener Detergenzien beobachtet. Nach Detergenzienzugabe konnte jedoch etwa 80 % des Signals durch scharfes Aufschütteln der Probe wiederlangt werden (s. Abb. 4.24). Nach Absättigung der Bindungsstellen der Glaswand war der Adsorptionsprozess demnach reversibel.

Aus dem Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> im *Western Blot* ist bekannt, dass wiederholtes Einfrieren zu einem Verlust an PrP<sup>Sc</sup>-Signal führen kann (Schulz-Schaeffer, persönliche Mitteilung). Daher wurde der Einfluss wiederholter Einfrierzyklen auf das SIFT-Signal untersucht (Abb. 4.25). Weder in verdünnter noch in konzentrierter Lösung kam es zu einem signifikanten Verlust an Signal. Nach zwölfmaligem Einfrieren einer 1  $\mu$ M Lösung von voraggregiertem A $\beta$ (1-42) auf Trockeneis lag das Peaksignal bei ca. 80 % der frisch vermessenen Probe. Diagnostische Tests an Alzheimerpatienten deuten jedoch darauf hin, dass die 'normale' klinische Handhabung, d.h. langsames Einfrieren und unterschiedliche Probengefäße, einen stärkeren Einfluss auf die Menge amyloider Aggregate hat (Pitschke, persönliche Mitteilung).

Die unspezifische Bindung mehrerer Sonden an große Partikel, d.h. nicht an PrP- oder A $\beta$ -Aggregate, sondern beispielsweise an Proteincluster oder Polysaccharide aus der Probe, führt zur Maskierung des spezifischen Signals. Anders als die unspezifische Aggregation einer Sonde, deren Signal in der Auswertung abgetrennt werden kann, führt die spezifische Bindung an unerwünschte Bindungspartner zu falsch-positivem Signal. Das Prionprotein ist als Membranprotein auf der Oberfläche von Zellen und Zellfragmenten gebunden. Damit kann es als Bindungspartner für die Antikörpersonden fungieren. Spinalliquor ist zwar weitgehend frei von Zellbestandteilen, er enthält jedoch Leukozyten in einer Menge von 10-50 Zellen/ $\mu$ l. Diese Zahl kann im Einzelfall aufgrund entzündlicher Prozesse auch stark erhöht sein.

Durch Zugabe von Leukozyten zu einer Liquorprobe wurde durch Bindung der PrP-Sonden an diese Zellen ein Signal erzeugt, das dem PrP<sup>Sc</sup> spezifischen Signal gleicht. Sowohl das spezifische Signal der PrP-Aggregate als auch das unspezifische der Zellbindung wird durch Zugabe von Detergenzien abgewächt. Zugabe von Detergenzien schwächte das unspezifische Signal jedoch in einem stärkeren Maße ab als das spezifische Signal der Zielmoleküle. Das optimale Verhältnis zwischen spezifischen und unspezifischen Signal wurde durch die Zugabe von NP40 in einer Konzentration von 0.1% erreicht.

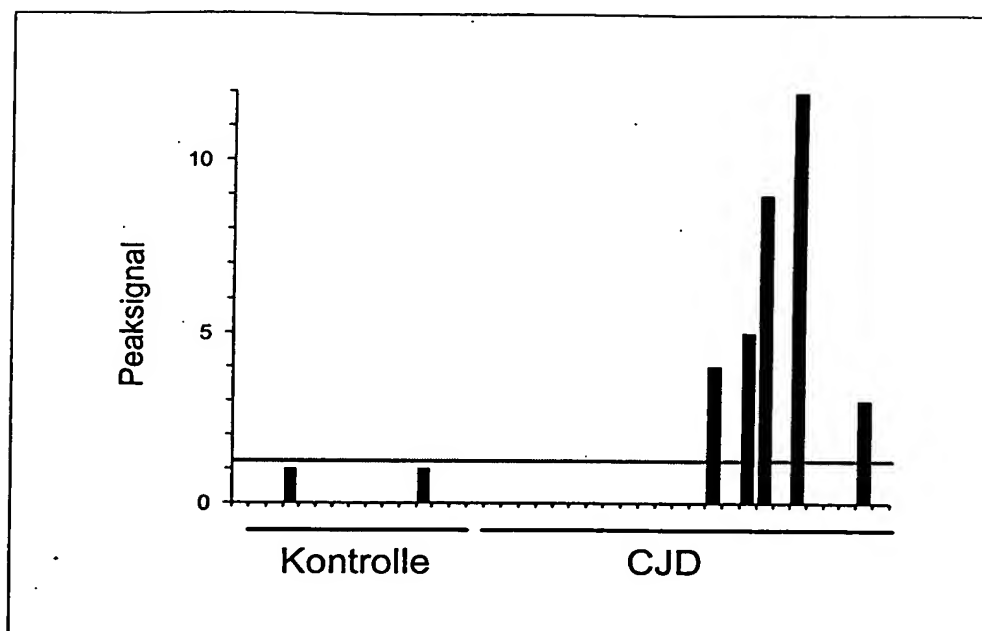
## Liquordiagnostische Anwendung

Ein Hauptziel der Untersuchungen bestand in der Entwicklung eines diagnostischen Systems zum hochempfindlichen Nachweis pathologischer Aggregate zur Diagnose der Creutzfeldt-Jakob und der Alzheimerschen Erkrankung. Als Untersuchungsmedium bietet sich aus drei Gründen die Untersuchung des Spinalliquors an: Erstens umspült der Liquor das Zentralnervensystem des Menschen. Er ist damit nicht wie z.B. das Blut durch die Blut-Hirn Schranke vom Entstehungsort der pathologischen Aggregate separiert. Zweitens handelt es sich bei Liquor um ein 'sauberes' Medium. Er enthält kaum Zellen oder Proteine, die im Bereich der Anregungswellenlängen absorbieren oder selbst fluoreszieren und eignet sich damit gut für fluoreszenzspektroskopische Messungen. Drittens kann er durch Rückenmarkspunktion vergleichsweise einfach und risikolos vom Patienten gewonnen werden. Zum Nachweis neurodegenerativer Sekundärmarker wie dem 14-3-3 Protein geschieht dies im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen.

### Detektion von pathogenem PrP im Liquor von CJD Patienten

Der Detektionsansatz, der am Modellsystem der *prion-rods* entwickelt und evaluiert wurde, diente auch zum Nachweis von pathologischen Aggregaten des Prionproteins im Spinalliquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten. Die Liquorproben wurden direkt mit dem Sondenmix versetzt und 600 s im Zweikanal-SIFT-Messaufbau vermessen. In fünf von 24 Liquorproben der Patienten, deren CJD-Diagnose anhand von klinischen oder neuropathologischen Kriterien gesichert war (vgl. Kap. 3.1.4), konnte so ein spezifisches Signal detektiert werden, das der gleichzeitigen Bindung beider Sonden an ein  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregat entsprach. Als Kontrollgruppe diente ein Patientenkollektiv mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, um sicherzustellen, dass der Test spezifisch für CJD war und nicht nur einen Sekundäreffekt neurodegenerativer Erkrankungen erkannte. Aus keiner der Proben der Kontrollpatienten wurde ein Signal erhalten, das für  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  spezifisch war (s. Abb. 4.26). Dies entspricht formal einer Sensitivität von 21 % und einer Spezifität von 100 % für den Nachweis der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung. Dies ist bislang der höchste Wert eines erregerspezifischen Tests im Liquor eines Patienten[15].



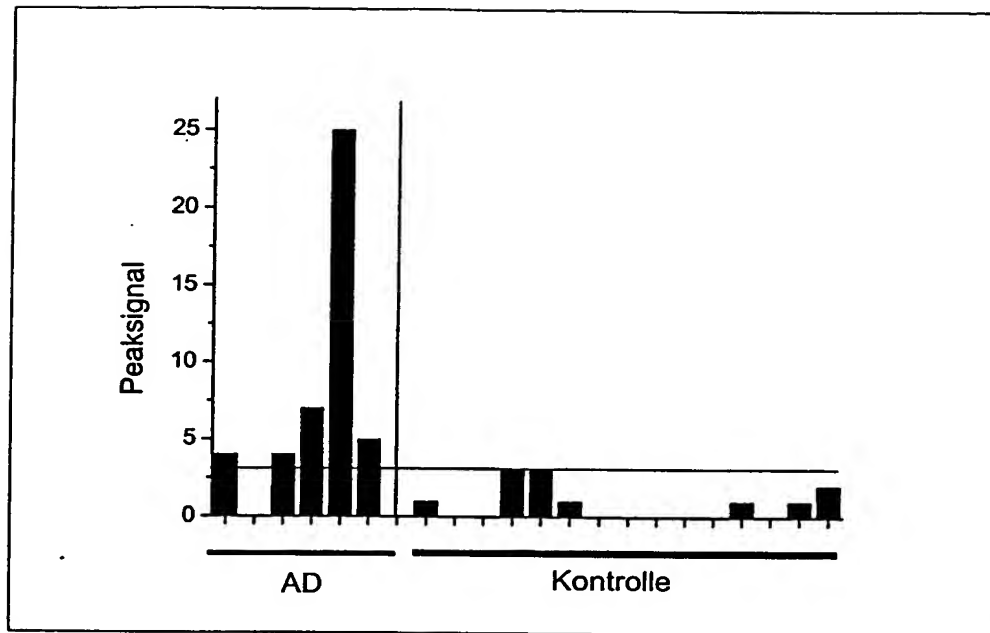


Figur 4.26: Zweikanal-SIFT Messung im Liquorproben von CJD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in Abb. 4.18 beschrieben. Als Sonden dienten die monoklonalen Antikörper 3F4-Alexa488 und 12F10-Cy5. In 5 von 24 CJD-Liquorproben lag das Signal über einer Schwelle von einem Kanal, dagegen enthielt keine der Kontrollen mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen positives Signal.

### Liquordiagnose von Morbus Alzheimer

Die Alzheimersche Erkrankung ist durch die erhöhte Entstehung von Fragmenten eines Transmembran-Proteins, dem sogenannten Amyloid-Precursor-Protein (APP), gekennzeichnet, die in einem Folgeprozess aggregieren und amyloide Ablagerungen bilden. Anders als das pathologische  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sind die amyloiden  $\text{A}\beta$ -Peptide als normale Stoffwechselprodukte auch im gesunden Menschen in geringer Menge nachzuweisen. Eine pathologisch erhöhte Menge an aggregierten Peptiden ist daher durch einen Schwellenwert zu definieren.

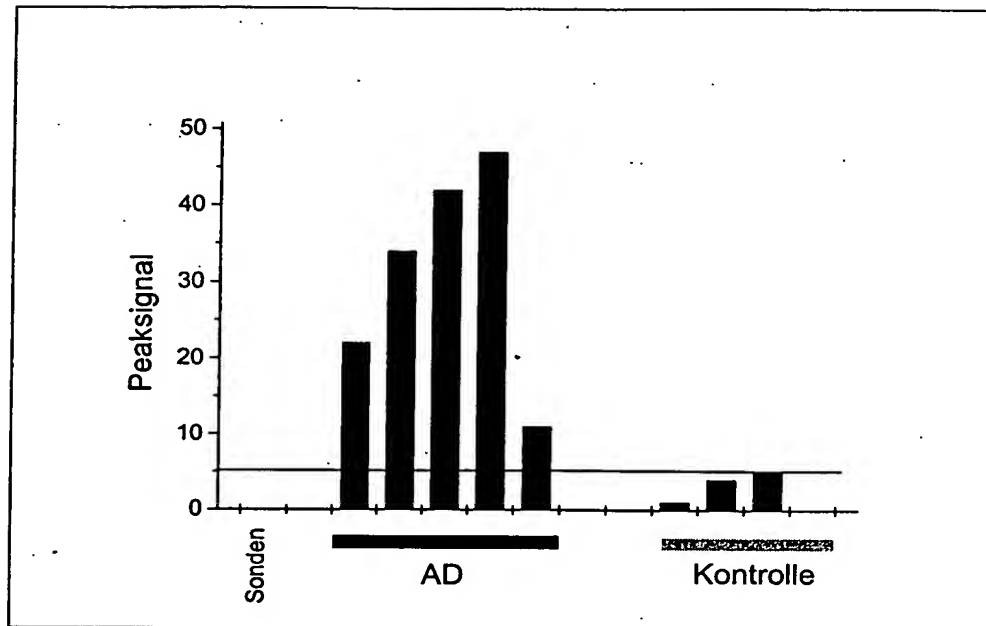
Mittels der Zweikanal-Intensitätsanalyse wurden unbehandelte Liquorproben von sechs Alzheimer Patienten sowie 16 Proben von Patienten, die an anderen neurodegenerativen Erkrankungen litten, sowie von gesunden Patienten untersucht. Dabei



Figur 4.27: Zweikanal-SIFT Messung in Liquorproben von AD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in 4.18 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper pAB42-Alexa488 und 6E10-Cy5. In 5 von 6 Patienten mit klinischer Alzheimerdiagnose, jedoch in keiner der Kontrollen lag das Signal über dem gesetzten Schwellenwert.

wurde das Antikörper-Sondensystem verwendet, das anhand von künstlichen A $\beta$ 42 Aggregaten etabliert und evaluiert worden war. In 83 % (5 / 6 Fällen) der untersuchten Spinalliquor-Proben von Alzheimer-Patienten lag die Menge an aggregat-spezifischem Signal über dem gesetzten Schwellenwert. Dagegen lag das Signal aller Kontrollpatienten darunter (s. Abb. 4.27).

Bei den untersuchten Liquorproben handelt es sich sowohl im Falle der Alzheimer- als auch der Creutzfeldt-Jakob-Patienten um solche, die im Rahmen von klinischen Routineuntersuchungen, wie z. B. dem Nachweis des neurodegenerativen Sekundärmarkers 14-3-3, gewonnen wurden. Sie sind hinsichtlich ihrer klinischen Vorgeschichte daher sehr heterogen. Es wurde eine Serie von 5 AD Proben und 4 Kontroll-Liquorproben untersucht, die eigens asserviert wurden. Hier konnte in den AD-positiven Probe eine deutlich größere Menge amyloider Aggregate nachgewiesen



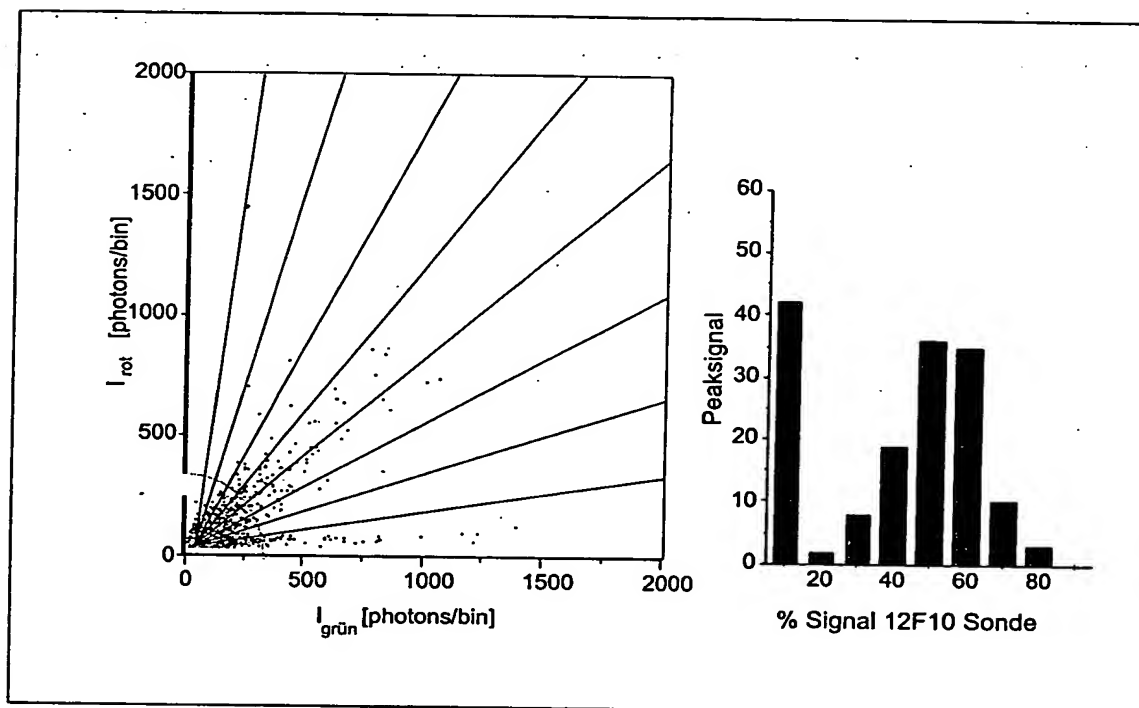
Figur 4.28: Zweikanal-SIFT Messung in Liquorproben von AD und Kontrollpatienten. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Binweite von 0.5 ms wie in 4.18 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper pAB42-Alexa488 und 6E10-Cy5. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme asserviert (s. Kap. 3.1.4).

werden als in den Proben aus der klinischen Routinediagnostik, was die Bedeutung der Probenvorbereitung unterstreicht.

## Differenzierung von Prionstämmen

Für die Detektion pathologischer Aggregate im Rahmen der diagnostischen Systeme wurde in der Zweikanal-Intensitätsanalyse allein ausgewertet, ob ein Aggregat mit einer großen Zahl beider Sondenmoleküle markiert war. Im Gegensatz zur Korrelationsanalyse, die Aussagen über die mittlere Konzentration und den Markierungsgrad der detektierten Moleküle liefert, erfasst die Intensitätsanalyse das Signal jedes detektierten Partikels separat. Daher erlaubte sie, das Verhältnis des Signals in beiden Messkanälen und damit das Verhältnis der gebundenen Sonden für jedes Zielmolekül zu bestimmen. Damit war neben der Detektion von Aggregaten auch

ihre Charakterisierung anhand der relativen Affinität mehrerer Sonden möglich.

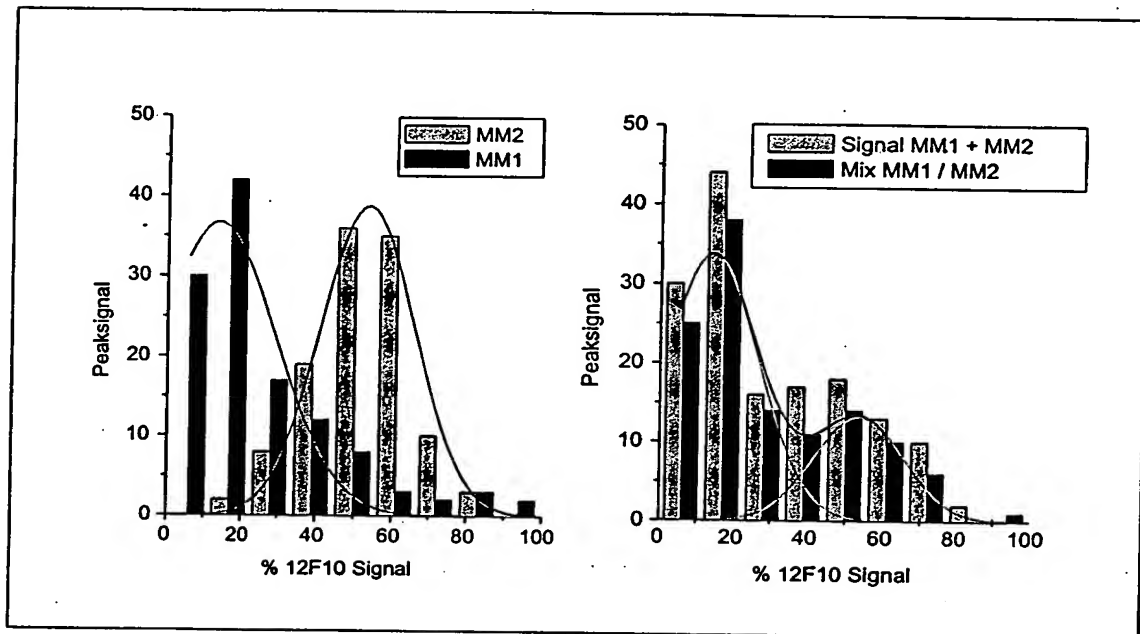


Figur 4.29: Bestimmung des Bindungsverhältnisses der Sonden. Signal einer Zweikanal-SIFT Messung an humanem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (129M/M) Typ II. Die Messung erfolgte für 600s mit einer Kanalweite von 0.5 ms wie in 4.18 beschrieben. Als Sonden dienten die Antikörper A917-Alexa488 und 12F10-Cy5. Das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -spezifische Signal  $> 8 \cdot I_{\text{max}}$  wurde in neun Sektoren gleicher Signalverhältnisse aufsummiert.

Die differentielle Bindung einer Anzahl unterschiedlicher monoklonaler Antikörper-sonden an pathologisches Prionprotein wurde an aufgereinigtem menschlichem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  untersucht. Dabei war es möglich verschiedene Typen des rathogenen Prionproteins zu differenzieren.

Die Messung erfolgte im gleichen Messaufbau wie die diagnostische Anwendung. Zur Bestimmung des Verhältnisses des Signals der beiden fluoreszenzmarkierten Sonden in einer Messung wurde das Intensitätshistogramm der Zweikanal-Intensitätsanalyse in Sektoren gleichen Signalverhältnisses unterteilt. In jedem Sektor wurde die Zahl der Messkanäle, deren Intensität über einem Schwellenwert lag, bestimmt (Abb. 4.29). Das aggregatspezifische Signal wurde über eine Schwelle von  $8 \cdot \sigma$  ab-

getrennt. Das Signal hoher Intensität konnte mit dieser Schwelle sicher vom Sonden-signal separiert werden. Ein Störsignal der unspezifischen Sondenaggregation wurde hingegen nicht vom restlichen Signal hoher Intensität getrennt. Aus diesem Grund enthält der Sektor, in dem das Signal mit einem Anteil der roten Sonde von 0-10 % zusammengefasst ist, in allen Messungen einen Anteil unspezifischen Signals. Dieser Anteil wurde in Referenzmessungen bestimmt und vom aggregatspezifischen Signal abgezogen.



Figur 4.30: PrP<sup>Sc</sup> Typ I und Typ II im SIFT-Signal von humanem PrP<sup>Sc</sup> (129 M/M). Das gereinigte PrP<sup>Sc</sup> wurde 1:10 in Liquor von Kontrollpatienten unter Zugabe von 0.1% NP40 verdünnt. Messung und Auswertung erfolgte wie in Abb. 4.29 beschrieben. a) Signalanteile beider Sonden in der Messung von M/M Typ I und M/M Typ II PrP<sup>Sc</sup> mit Anpassung durch eine Normalverteilung. b) Signalanteile beider Sonden in der Summation der Einzelmessungen von PrP<sup>Sc</sup> Typ I und Typ II (grau) sowie Messung einer Mischung beider PrP<sup>Sc</sup> Typen.

Die Trennung der Priortypen wurde mit verschiedenen Sondenpaaren und Detergenzienzusätzen optimiert. Aufgereinigtes pathogenes Prionprotein von Typ I und Typ II zweier an Codon 129 M/M homozygoter Patienten konnte anhand der relativen Sondenbindung charakterisiert werden. Dabei ließen sich beide Konfor-

mation reproduzierbar anhand des Bindungsverhältnisses der Sonden differenzieren (Abb. 4.30 a). Das aggregatspezifische Signal des Typs II (129 M/M) zeigt eine Normalverteilung um ein Sondenverhältnis von  $55 \pm 15\%$ . Das zusätzliche Signal mit einem grünen Anteil  $\geq 90\%$  ist vermutlich auf Aggregation bzw. Vernetzung der Sonde zurückzuführen. Dagegen ist das Markierungsverhältnis im PrP<sup>Sc</sup> Typ I zugunsten der grün markierten Sonde verschoben (mAB 917-Alexa). Nach Abzug des sondeninhärenten Signalanteils liegt das Verteilungsmaximum hier bei einem Anteil der grün markierten Sonde von  $85 \pm 20\%$ .

Um sicherzustellen, dass die Differenzierung aufgrund der Konformation des Zielmoleküls und nicht aufgrund von Sekundäreffekten, wie z. B. Kontaminationen aus der Aufarbeitung der Proben, erfolgte, wurde eine Mischung von Typ I und Typ II des PrP<sup>Sc</sup> analysiert. Zwar überlagern sich die Verteilungen beider Typen, doch ist die Gesamtverteilung der Mischung weitgehend deckungsgleich mit der Summe der Intensitätsverteilungen, die aus Einzelmessungen gewonnen wurden (Abb. 4.30 b). Die unterschiedliche Affinität der Sonden ist also auf die Konformation des Zielmoleküls und nicht auf Kontaminationseffekte zurückzuführen. Ist das Verteilungsmaximum der Priontypen durch Eichmessungen bestimmt worden, lassen sich auch ohne vollständige Trennung der Verteilungen die Anteile von Typ I und Typ II PrP<sup>Sc</sup> in den Proben bestimmen.

Zur Differenzierung des Signals der PrP<sup>Sc</sup>-Typen ist es nicht erforderlich, jeden Partikel mit der selben Effizienz zu detektieren. Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Charakterisierung einzelner Partikel durch die relative Bindungsaffinität mehrerer Sonden, wie z.B. der FACS-Analyse auf Zellebene, liefert die quantitative Detektion des Fluoreszenzsignals auf Basis einzelner Moleküldurchtritte einen internen Standard zur Bestimmung des Markierungsverhältnisses.

## Diskussion

Eine große Zahl neurodegenerativer Erkrankungen geht mit der Bildung pathologischer Proteinablagerungen einher [46]. Eine besondere Form pathologischer Ablagerungen sind amyloide Strukturen. Die Bildung amyloider Ablagerungen eines posttranslational modifizierten, zellulären Proteins steht im Zentrum der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung und der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) oder Prionkrankheiten. Während die Prionkrankheiten übertragbar sind, ist ein infektiöser Mechanismus für die Alzheimersche Erkrankung nicht beschrieben. Im Falle der TSE ist nach der Prionhypothese, die mittlerweile überwiegend anerkannt ist, das amyloidbildende Protein selbst das infektiöse Agens [123]. Es existieren vielfache Hinweise, dass die Aggregatform wesentliches Merkmal des infektiösen Agens oder Prions ist [96],[130],[53],[74]. Der Mechanismus der Amyloidbildung ist daher von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Alzheimerschen Erkrankung und der Prionkrankheiten. Vom diagnostischen Standpunkt sowie zur Entwicklung therapeutisch wirksamer Substanzen erscheint ein möglichst empfindlicher Nachweis des Erregers bzw. der pathologischen Aggregate wünschenswert. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bietet als Verfahren zur Detektion und Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung die geeigneten Voraussetzungen zur Untersuchung des Aggregationsprozesses sowie zum Nachweis der pathologischen Aggregate.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *in vitro*-System die Aggregation des Prionproteins auf der Ebene einzelner Moleküle untersucht. Als Modell für die Untersuchung der Aggregation diente ein rekombinant hergestelltes Fragment des Prion-

proteins, das in seiner Aminosäuresequenz dem Protease-resistenten Kern des pathogenen PrP<sup>Sc</sup> entsprach (rPrP 90-231), der die Hauptkomponente pathogener Aggregate *in vivo* bildet.

Zur Charakterisierung des Aggregationsprozesses wurde in erster Linie die konfokale FCS in dem von Schwille [109] entwickelten Zweifarben-Kreuzkorrelationsaufbau eingesetzt. Dabei diente monomeres PrP, das mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert war, als Sonde. Es konnten zwei unterschiedliche Mechanismen der Aggregation charakterisiert werden. Einerseits aggregiert monomeres PrP *de novo* unter mehreren Zwischenschritten zu multimeren Einheiten. Andererseits lagert es sich schnell an Aggregationskeime und Aggregate an, die bereits in Lösung vorliegen. Der zweite Prozess kann zum Nachweis einzelner Aggregate von pathologischem Prionprotein und amyloidem A $\beta$ -Peptid dienen und hat daher großes diagnostisches Potential.

Der Messaufbau wurde für die Erfordernisse der diagnostischen Anwendung weiterentwickelt. Zu diesem Zweck wurde eine Scanvorrichtung und ein Verfahren zur quantitativen Auswertung der Fluoreszenzintensität einzelner Partikel entwickelt. Erst die Kombination beider Techniken führte zu einer entscheidenden Steigerung der Detektionssensitivität des „Scannens intensiv fluoreszierender Targetmoleküle“ (SIFT). Die fluoreszenten Sonden wurden hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität optimiert. Damit gelang es, Aggregate des pathologischen Prionproteins und der A $\beta$ -Peptide in femtomolarer Konzentration zu detektieren. Sowohl im Falle des Morbus Alzheimer als auch erstmals im Falle der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung ließen sich pathologische Aggregate spezifisch im Spinalliquor erkrankter Patienten nachweisen. Die Detektion pathogener Aggregate im Signal der Zweikanal-Fluoreszenzintensitäts-Analyse, kurz SIFT-Signal, kann damit nicht nur die Basis eines hochempfindlichen erregerspezifischen Tests bilden, sondern erlaubt darüber hinaus eine Charakterisierung der Aggregate anhand der Bindungsaffinität verschiedener Sondenmoleküle.

Im Folgenden soll ausführlich auf die Untersuchungen zur Aggregation und ihre Relevanz für die Konversion des Prionproteins, sowie auf Stärken und Grenzen des Verfahrens zum Nachweis einzelner pathogener Aggregate eingegangen werden.



## Aggregationsmechanismus des rekombinanten Prionproteins

Die pathologische Form des Prionproteins ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) lässt sich in Form von fibrillären Aggregaten, den sogenannten *prion rods*, aus Hirngewebe von Menschen und Tieren isolieren, die an TSE erkrankt sind. Hauptkomponente der Aggregate ist die N-terminal trunkierte Form des PrP, das PrP (27–30). PrP (27–30) lässt sich durch ionische Detergenzien in Kombination mit Ultrabeschallung [93] oder Extraktion in organischen Lösemitteln [130] oligo- bzw. monomer in Lösung bringen. Dabei geht die  $\beta$ -Faltblattstruktur des Proteins verloren. Unter geeigneten Bedingungen reaggregiert das solubilisierter PrP, wobei eine  $\beta$ -Faltblattstruktur und eine teilweise Proteaseresistenz wiederhergestellt werden [93]. Rekombinantes PrP (90–231), das in der Aminosäuresequenz dem aggregatbildenden pathologischen PrP (27–30) gleicht, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Modellsystem zur Untersuchung des Aggregationsmechanismus verwendet. Wie im Falle des solubilisierter PrP (27–30) lässt sich durch Lösen in einem ionischen Detergenz und anschließendes Ausdünnen des Detergenz eine Strukturumwandlung unter Bildung von Aggregaten induzieren (s. Kap. 4). Das aggregierte PrP lässt sich durch Ultrazentrifugation sedimentieren. Wie beim solubilisierter  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  geht die Aggregation mit einer Umwandlung  $\alpha$ -helikaler in  $\beta$ -Faltblatt Strukturen einher [91].

Fluoreszenzmarkiertes monomeres PrP (90–231) koaggregiert mit dem unmarkierten Protein und ermöglicht so, den Aggregationsprozess durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bei nanomolarer Konzentration zu verfolgen. Im Gegensatz zu klassischen Verfahren zur Aggregationsanalyse, wie der Messung der Lichtstreuung, lässt sich durch die FCS bereits die Bildung oligomerer, im Falle der Kreuzkorrelationsanalyse sogar dimerer Strukturen nachweisen. Sie eignet sich daher in besonderer Weise zur Untersuchung der initialen Aggregationsschritte. Es lassen sich mehrere Phasen des Aggregationsprozesses differenzieren: Eine initiale Di- und Oligomerbildung, ein darauf folgendes Wachstum der Oligomere und schließlich die Bildung großer Proteinmultimere.

Nach Ausdünnen des Detergenz erfolgt schnell, d.h. zum Teil noch während der Probenvorbereitungszeit, die quantitative Bildung von Di- und kleinen Oligomeren. Im selben Zeitbereich ist durch CD-Spektroskopie die Bildung von  $\beta$ -Falt-

blattstrukturen beobachtet worden [93]. Ob die Strukturumwandlung der initialen Dimerisierung vorangeht oder beide Prozesse gleichzeitig erfolgen, konnte bislang nicht geklärt werden, da die CD-Spektroskopie relativ hohe Proteinkonzentrationen erfordert und somit die Strukturumwandlung bereits während der Probenvorbereitung weitestgehend abgeschlossen ist [93]. Der initiale Bindungsschritt erzeugt im Autokorrelationssignal eine 20-30 % ige Zunahme der Diffusionszeit. Unter Einsatz zweier fluoreszenzmarkierter Sonden ließen sich durch Kreuzkorrelation beider Farben die initial gebildeten Oligomere vom Signal monomerer PrP-Moleküle und freier Farbstoffe trennen [8]. Bei einer Proteinkonzentration von 50 nM ließ sich der Bindungsprozess durch eine irreversible bimolekulare Dimerisierung mit einer Zeitkonstanten von  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  beschreiben. Bei einem Überschuss von unmarkiertem Protein lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die markierten Bindungspartner zuvor bereits mit unmarkiertem PrP reagiert haben. Für eine Beteiligung unmarkierter Moleküle spricht, dass der Bindungsprozess ohne einen Überschuss an unmarkiertem Protein erheblich verlangsamt ist. Die initiale Zunahme der Diffusionszeit um 30 % entspräche bei einer quantitativen Reaktion einer Bildung von Dimeren. Aufgrund der relativ großen Streuung der Diffusionszeiten lässt sich die Größe der initial gebildeten Oligomere nur auf 2-4 Monomere eingrenzen.

In der folgenden Phase verdoppelt sich die Diffusionszeit der initial gebildeten Di- oder Oligomere innerhalb von Stunden. Anhand der Diffusionszeit lässt sich abschätzen, dass ein Oligomer in diesem Stadium im Mittel etwa 15 Proteinmoleküle enthält. Der Wachstumsprozess lässt sich zeitlich klar vom initialen Bindungsschritt trennen (s. Kap. 4.1.2). Im Laufe des Aggregatwachstums nimmt zugleich die Heterogenität der Aggregatgröße zu. Lassen sich die Kreuzkorrelationskurven nach 1 h noch innerhalb der Fehlergrenzen durch eine Anpassung mit einer Diffusionskomponente beschreiben, so zeigt sich zu späteren Zeiten eine deutliche Abweichung der Messdaten von diesem Modell (s. Kap 4.1.3). Auch bei PrP (27-30) wurde durch Trennung in einem Sucrosegradienten eine stark heterogene Aggregatgröße festgestellt, die hydrophoben Wechselwirkungen zugeordnet wurde [94]. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden auch in der Aggregation von amyloidogenem Lysozym [11] und der Bildung von Calcitonin-Fibrillen im Menschen [4] beobachtet. Bemerkenswert war der Verlauf der Partikelzahl und der Fluoreszenzintensität im Aggregationsprozess. Erfolgt der initiale Dimerisierungsschritt quantitativ, so muss die Konzen-

tration der Oligomere im Laufe des Aggregatwachstums abnehmen. Ändert sich die Fluoreszenzausbeute bei der Oligomerisierung nicht, so bleibt die Gesamtfluoreszenz der rot- und der grünmarkierten Moleküle dagegen gleich, so dass die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion abnimmt. Dieser Verlauf wurde auch in der Messung der Kreuzkorrelation beobachtet (s. Kap 4.1.3).

Im Verlauf der Aggregation nimmt jedoch auch die Gesamtfluoreszenz beider Fluorophore ab. Dies geschieht durch die Überlagerung zweier Effekte: Zum einen werden die Moleküle durch Adsorption mit einer charakteristischen Zeitkonstante von etwa 20 min ausgedünnt. Dies allein kann jedoch nicht den eigentümlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität und der Molekülzahl erklären, die während des Aggregationsprozesses ein Minimum durchläuft (s. Abb. 4.10). Neben der Abnahme der Fluoreszenz durch den Adsorptionsprozess beobachtet man eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute der Fluorophore durch die Oligomerisierung. Der zeitliche Verlauf der Intensität und der als inverse Amplitude der Autokorrelationsfunktion definierten Molekülzahl lässt sich im Rahmen einer quantitativen Dimerisierungs- oder Oligomerisierungsreaktion modellieren, wenn man eine Verringerung der Quantenausbeute auf 20 % des Monomers annimmt.

Diese Annahme erscheint gerechtfertigt, wenn man zugrunde legt, dass die Markierung des PrP bevorzugt am Lysinrest der Aminosäure 109 erfolgt. Nach Fluoreszenzmarkierung lässt sich PrP (90-231) im *Western Blot* nicht mehr durch den Antikörper 3F4 detektieren (Post, persönliche Mitteilung), dessen Bindungsepitop die Aminosäuren 107-110 bilden [61]. Es wird angenommen, dass die Aminosäuren 90-120 Teil der Bindungsoberfläche für die Dimerisierung des PrP-Moleküls sind [24]. Es ist zugleich ein  $\alpha$ -helikaler Bereich des Proteins, in dem besonders starke Strukturänderungen zu erwarten sind [103]. Das Anbringen einer Fluoreszenzmarkierung in diesem strukturelevanten Bereich des Proteins birgt auch die Gefahr, den Prozess der Strukturumwandlung zu beeinflussen. Um den Einfluss des Fluorophors auf den Aggregationsprozess zu minimieren, betrug der Anteil des markierten PrP nur 5 % des Gesamtproteins. Der Einfluss der Position des Fluorophors könnte bestimmt werden, indem man durch gezielte Punktmutation Aminosäuren einfügt, die dann spezifisch markiert werden können. Anders als das PrP voller Länge, dessen N-Terminus nach NMR-Untersuchungen in Lösung weitgehend unstrukturiert ist [103], befinden sich im proteaseresistenten Kern allerdings keine Bereiche, die a

priori irrelevant für die Strukturänderung des Proteins wären.

Die dritte Phase des Aggregationsprozesses ist die Bildung großer multimerer Aggregate. Die ersten Aggregate treten nach  $\sim 1$  h auf, ihre Zahl nimmt im Verlauf von Tagen weiter zu. Das Wachstum der Oligomere verläuft also nicht homogen. Es ist vielmehr anzunehmen, dass das Aggregatwachstum ab einer bestimmten kritischen Oligomergröße sehr schnell verläuft. Die Multimere sind in ihrer Größe wiederum heterogen. Ihre Diffusionszeiten reichen von einigen Millisekunden bis hin zu 100 ms. Die Multimere enthalten dementsprechend  $10^3$  bis  $10^5$  Monomere. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Aggregaten, die in analoger Weise erzeugt wurden, zeigen eine globuläre Struktur mit einem Durchmesser von etwa 25 nm, die sich zu weiteren amorphen Strukturen zusammenlagern [93]. Damit unterscheiden sich die Multimere klar von der fibrillären Struktur der *prion rods* des PrP (27–30) [96]. Liegen multimerer Aggregate bereits in Lösung vor, so erfolgt die Anlagerung weiterer monomerer Einheiten wiederum innerhalb von Minuten (s. Kap. 4.2.1). Dieses Verhalten entspricht dem einer keiminduzierten Aggregation nach dem Nukleationsmodell [53],[37].

Das Aggregationsverhalten verschiedener A $\beta$  Peptide lässt sich durch ein Nukleationsmodell beschreiben [119]. Auch die Aggregation von Calcitonin folgt einem doppelten Nukleationsmodell [4]. Für die Strukturumwandlung des Prionproteins in seine pathologische Form wurden von Lansbury [53] das Modell der keiminduzierten Aggregation analog zum A $\beta$ -Peptid vorgeschlagen. Einige Aspekte der Aggregation des PrP (90–231) entsprechen dem Lansbury-Modell. So erfolgt die Aggregation unter Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen [93]. Auch wird eine Verzögerungsphase bis zum Auftreten multimerer Aggregate beobachtet (s. Kap. 4.1.3), so dass sich der Prozess bei alleiniger Detektion multimerer Aggregate nach dem Nukleationsmodell beschreiben ließe. In den einzelnen Aggregationsschritten zeigen sich jedoch erhebliche Unterschiede.

Das Modell der keiminduzierten Aggregation geht davon aus, dass das thermodynamische Gleichgewicht zwischen monomerem und oligomerem Protein auf Seiten der Monomere liegt. Wie von Eigen [37] gezeigt, ist damit die Gesamtkonzentration aller pränuklearer Zustände viel geringer als die der Monomere (s. auch Kap. 2.4.3). Das Nukleationsmodell kann damit die späte Phase der Aggregation beschreiben in der plötzlich vereinzelte Multimere auftreten, nicht jedoch die initiale quantitative

Bildung von Di- und Oligomeren. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass ein mehrstufiger Prozess der Aggregation vorliegt, in dem die initial gebildeten Oligomere eine kritische Größe erreichen und dann zu großen Aggregaten konglomerieren.

Nimmt man für die Strukturumwandlung des PrP einen autokatalytischen Mechanismus an, so erfordert der Verlauf der Erkrankung einen kooperativen Prozess der Bildung des pathologischen PrP<sup>Sc</sup> [37] (s. auch Kap. 2.4.2). Ob der initiale Schritt der Oligomerisierung der Aggregation des PrP (90–231) kooperativ verläuft, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmen. Bei den Proteinkonzentrationen, die in dieser Studie eingesetzt wurden, könnte ein kooperativer Prozess so schnell verlaufen, dass er durch die FCS-Messung nicht aufgelöst wird. Eine andere Ursache für eine fehlende Kooperativität können die Ausgangsbedingungen der Aggregation sein.

Um die Aggregation auszulösen, wird das Protein zunächst in einem Puffer mit ionischem Detergenz gelöst, wobei die Konzentration des Detergenz knapp unter der kritischen Mizellenkonzentration liegt. Dies wird als Modell für die Bindung des Proteins an die Zellmembran diskutiert [93], [91]. Man kann daher nicht davon ausgehen, dass seine Konformation vollständig der nativen Konformation des PrP<sup>C</sup> entspricht. In der nativen Konformation besitzt das Protein einen hydrophilen N-terminus und ist C-terminal über einen Glyco-Phospholipidanker mit der Membran verknüpft. Bei der Solubilisierung von Proteinen durch die Bindung von Detergenzmolekülen lassen sich abhängig von der Konzentration des Detergenz drei Phasen unterscheiden. Bei niedriger Konzentration binden durch hydrophobe Wechselwirkungen zunächst einzelne Detergenzmoleküle an diskrete Bindungsstellen des Proteins [120]. So bindet das Protein BSA 8–10 Moleküle SDS [101]. Die Tertiärstruktur des Proteins bleibt dabei erhalten. Knapp unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) erfolgt dann eine massive Bindung von Detergenzmolekülen an die Proteinoberfläche, zunächst unter weitgehender Erhaltung der Struktur. In einem dritten kooperativen Schritt wird das Protein schließlich denaturiert [63]. Die SDS-Konzentration, die zur Solubilisierung des PrP eingesetzt wird, liegt nur wenig unter der CMC, so dass eine massive Bindung von SDS-Molekülen zu erwarten ist. Man könnte vermuten, dass die SDS-Bindung die Struktur des PrP soweit verändert hat, dass es in einem aktivierten Zustand für die Strukturumwandlung zur hydrophoben Konformation vorlag, analog zur Bindung eines Chaperone-Proteins, die im Rahmen der

Prionhypothese diskutiert wird [117]. Ausdünnung des Detergenz hätte dann eine quantitative Umwandlung in die stabilere  $\beta$ -Faltblatt Struktur zur Folge.

## Aggregation als Schlüssel zur Prionhypothese?

Die Untersuchungen zur Aggregation des Prionproteins haben gezeigt, dass das PrP eine plastische, potentiell instabile Struktur besitzt. Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformationen lässt sich leicht durch eine hydrophile bzw. hydrophobe Umgebung beeinflussen. Dabei kann eine Umwandlung  $\alpha$ -helikaler Strukturelemente in  $\beta$ -Faltblätter induziert werden, die eine Aggregation des Proteins zur Folge hat. Dies wirft die Frage auf, wie stabil die Struktur des PrP, die durch NMR-Untersuchungen bestimmt wurde, unter physiologischen Bedingungen ist. Die Struktur des Proteins voller Länge unterscheidet sich von der des C-terminalen proteasere-sistenten Kerns im NMR-Spektrum nur durch einen unstrukturierten N-terminalen Bereich [103]. *In vivo* ist das zelluläre Protein durch einen GPI-Anker an der Zellmembran stabilisiert. Wie die Untersuchung der Aggregation des PrP zeigt, ist die Struktur des Proteins in Lösung nicht mehr uneingeschränkt stabil. Untersuchungen zur Kompartimentierung des PrP weisen darauf hin, dass pathologisches PrP<sup>Sc</sup> in lipidreichen Kompartimenten, sogenannten Caveolae, akkumuliert [132]. Es wird daher spekuliert, ob die Umwandlung des zellulären PrP in PrP<sup>Sc</sup> bevorzugt in diesen Kompartimenten erfolgt. In jedem Fall steht die Aggregation des pathogenen Prionproteins im Zentrum der Pathogenese der Prionkrankheiten. Bislang ließ sich die Infektiosität nicht von der Aggregatform des PrP<sup>Sc</sup> trennen, wobei eine infektiöse Einheit (ID<sub>50</sub>)  $10^4$ – $10^5$  PrP-Monomeren entspricht [1], [97]. Eine Solubilisierung des Agens führt zum Verlust der Infektiosität [93], [130]. Die tierexperimentellen Befunde zur Abhängigkeit der Inkubationszeit von der infektiösen Dosis und zum Abbau des Erregers *in vivo* lassen sich durch ein Nukleationsmodell beschreiben das eine Mindestgröße des Nukleationskeimes von  $n = 6$  und eine mittlere Aggregatgröße von  $n = 1000$  Monomeren besitzt [74]. Dabei wurde eine konstante Rate angenommen, mit der gebildete fibrilläre Aggregate zerbrechen. Die mittlere Größe der PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate aus den Modellrechnungen entspricht der Aggregatgröße, die im Rahmen des diagnostischen Modellsystems durch die SIFT-Messung als mittlere Größe der

*prion rods* bestimmt wurde.

## Detektion einzelner amyloider Aggregate

Die Bildung von Aggregaten eines posttranslational modifizierten, zellulären Proteins steht im Zentrum der Pathogenese der Prionerkrankungen und der Alzheimerschen Erkrankung. Ein empfindlicher Nachweis der pathologischen Aggregate kann daher als diagnostischer Test genutzt werden. Legt man die Prionhypothese zugrunde, so ist der Nachweis pathologischen, aggregierten Prionproteins sogar *erregerspezifisch*. Es existieren mehrere diagnostisch nutzbare Markerproteine für neurodegenerative Prozesse, wie das 14-3-3 Protein [134], die neuronenspezifische Enolase (NSE) [133] und das S-100 Protein. Diese Proteine treten vermehrt beim massiven Untergang von Nervenzellen bzw. der begleitenden Gliose auf, detektieren jedoch nicht das infektiöse Agens. Sie erlauben daher eine Diagnose nur in Kombination mit weiteren klinischen Untersuchungen. Den Standard zum Nachweis des Erregers der Prionkrankheiten bildet nach wie vor die experimentelle Übertragung auf Versuchstiere [95]. Ein zweiter Ansatz nutzt die Proteaseresistenz des PrP<sup>Sc</sup>, so dass sich nach Verdau mit einer Protease unverdautes Prionprotein durch *Western blot* oder ELISA-Verfahren nachweisen lässt.

Die konfokale Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bildet als Verfahren zur Charakterisierung einzelner Moleküle die geeignete Basis für einen hochempfindlichen einfachen Test, der auf der Aggregation des pathologischen Agens beruht. Das Verfahren ist damit sowohl auf Prionkrankheiten als auch auf andere Erkrankungen wie Morbus Alzheimer anwendbar, die durch die Bildung pathologischer Aggregate charakterisiert sind. Bei der Entwicklung eines diagnostischen Verfahrens sind dabei mehrere Teilaufgaben zu lösen: Die Entwicklung eines SONDENSYSTEMS zum spezifischen Nachweis pathologischer Aggregate und zur Unterdrückung falsch-positiven Signals und die Trennung und Quantifizierung des spezifischen Signals in SIFT- und Kreuzkorrelationsanalyse. Schließlich muss das diagnostische System evaluiert werden, um Grenzen und Entwicklungspotential der Methode herauszuarbeiten.

Um pathologische Aggregate fluoreszenzspektroskopisch nachweisen zu können, müssen sie spezifisch durch fluoreszierende Sonden markiert werden. Dies lässt sich durch zwei Strategien verwirklichen:

1. Inkorporation fluoreszenzmarkierter Monomere nach dem Mechanismus der keiminduzierten Aggregation und
2. spezifische Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Beide Verfahren haben konzeptionelle Stärken und Schwächen. Die Markierung durch Monomer-Sonden nutzt die unterschiedliche Aggregationskinetik von monomeren PrP bzw. A $\beta$ -Peptid in An- und Abwesenheit von Aggregaten. Die Anlagerung an Aggregate erfolgt schneller als die Bildung großer Multimere nach *de novo* Aggregation ([92], s. auch Kap. 4.2.1). Prinzipiell ließen sich nach diesem Ansatz auch kleinere Aggregate empfindlich nachweisen, da durch die Anlagerung von Monomeren ein weiteres Aggregatwachstum induziert wird. Potentiell wird so eine hohe Sensitivität der Detektion erreicht. In der Praxis ist jedoch die Sensitivität der monomeren Bausteine als Sondenmoleküle durch die Kontamination der Sonde mit Aggregaten sowie durch Selbstaggregation des Sondenmoleküls stark eingeschränkt (s. Kap. 4.2.5). Ein konzeptioneller Nachteil ist die geringe Spezifität, da sich offenbar monomere Sonden an alle amyloiden Strukturen anlagern. So lassen sich z.B. aggregiertes A $\beta$ -Peptid und PrP auch durch Anlagerung der jeweils komplementären Monomere nachweisen [91]. Spezifische Anlagerung und unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen kompetitieren beide mit der Bindung von Detergenzmolekülen, so dass eine Differenzierung amyloider Aggregate nur in einem sehr engen Bereich der Detergenzkonzentration möglich ist [91]. Wird diese Konzentration nur um 0.01 % überschritten, lagern sich die Sondenmoleküle nicht mehr an den nachzuweisenden Aggregaten an.

Bei Verwendung von Antikörpern, die gegen PrP bzw. A $\beta$ -Epitope gerichtet sind, erfolgt die Bindung dagegen mit hoher Spezifität und Affinität (s. Kap. 4.2.7). So könnten bei nanomolarer Sondenkonzentration noch PrP-Aggregate in femtomolarer Konzentration nachgewiesen werden. Die sehr hohe Bindungsaffinität der Antikörpersonden ist sicher auch durch die Vielzahl an potentiellen Bindungsstellen am Aggregat bedingt. Die lokale Konzentration an Bindungspartnern für den Antikörper, der bereits an ein Aggregat gebunden ist, ist sehr viel größer als die Gesamtkonzentration des PrP in Lösung. Sowohl Prion- als auch A $\beta$ -Aggregate konnten in Lösung hochspezifisch detektiert werden. Durch Wahl eines PrP spezifischen Antikörperpaares ließen sich *prion rods* in sub-nanomolarer Konzentration



vor einem 2500-fachen Überschuss an aggregiertem A $\beta$  detektieren. Bei optimaler Aufreinigung der Sonden lag die Menge der sondeninhärenten Aggregate unter der Nachweisgrenze der SIFT-Detektion. Dies führte gegenüber der PrP-Sonde zu einer Steigerung der Sensitivität um mehr als zwei Größenordnungen.

Die hohe Affinität der Antikörpersonden kann jedoch die Erkennung auch erschweren. Die Sonden sind hochspezifisch gegenüber dem jeweiligen Bindungs epitop, jedoch nicht gegenüber der pathologischen Konformation oder der Aggregatform. Daher werden Antikörpersonden auch durch PrP bzw. A $\beta$  gebunden, das entweder frei in Lösung oder an der Oberfläche von Zellen oder Zellbestandteilen vorliegt. Im Falle der Detektion von A $\beta$ -Aggregaten konkurriert freies A $\beta$ -Peptid um die Bindung der Antikörper. Dadurch verringert sich die Konzentration der Sonde, die effektiv zur Bindung der Aggregate zur Verfügung steht. Dies verringert wiederum die Markierungsdichte der Aggregate und verschlechtert die Trennung des aggregat-spezifischen Signals vom Hintergrund der freien Sonde. Anders als die A $\beta$ -Peptide liegt PrP nicht in nennenswerter Konzentration im Liquor vor. Es wird jedoch an der Oberfläche von Zellen exprimiert, so dass auch die im Liquor vorhandenen Leukozyten ein PrP-spezifisches, aber unerwünschtes Signal erzeugen, das dem spezifischen Signal von PrP-Aggregaten gleicht. Die unspezifische Bindung der Sonden kann durch Zugabe milder nichtionischer Detergenzien verringert werden, die weiten Einsatz zur Erhöhung der Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung finden [67]. Die Bindung an Zellen wird durch Zugabe von Detergenzien stärker unterdrückt als die Aggregatbindung. Ursache könnte die höhere Dichte an Antigen-Bindungsstellen im Aggregat sein.

Die normale Konzentration an Leukozyten liegt mit 10–50 Zellen /  $\mu$ l unter der Detektionsschwelle. Eine falsch positive Detektion tritt daher erst bei krankhaft erhöhter Leukozytenzahl auf, wie sie durch entzündliche Prozesse im ZNS ausgelöst wird. Detergenzzugabe verringert das Signal jedoch auch bei einer Konzentration von 500 Zellen /  $\mu$ l bis unter die Nachweisgrenze (s. Kap. 4.2.7). Eine weitere Verzehnfachung der Detergenzkonzentration führte dagegen nur zu einer Halbierung des spezifischen Signals.

Anders als monomere Sonden erfordern Antikörpersonden jedoch Aggregate, die eine gewisse Zahl an Bindungsstellen aufweisen, so dass eine große Zahl Sondenmoleküle an das Aggregat binden können. Da die Abtrennung des spezifischen Signals

über die Fluoreszenzintensität des einzelnen Aggregats erfolgt, werden prinzipiell große Aggregate besser vom Sondenbackground getrennt als kleine. Der Zusammenhang zwischen Markierungsdichte und Sensitivität des Verfahrens soll im Rahmen der Möglichkeiten und Grenzen der Sensitivitätssteigerung näher erörtert werden.

### Abtrennung des spezifischen Signals

Die Detektion eines einzelnen Moleküls ist über einen Schwellenwert definiert, der das Signal vom Rauschhintergrund trennt. Im Fall der Aggregatdetektion bildet das Signal der freien fluoreszenzmarkierten Sondenmoleküle den Hintergrund, vor dem das Zielmolekül detektiert werden muss. Dabei ist das Verhältnis von spezifischem Signal zum Rauschhintergrund der entscheidende Parameter, der die Effizienz der Detektion eines Moleküls (MDE) bestimmt [5]. Dementsprechend ist eine Markierung der Aggregate mit einer hohen Zahl von Sondenmolekülen anzustreben. Neben dem Signal / Rausch ( $S/N$ )-Verhältnis bestimmt auch die Form der Intensitätsverteilung die Detektionseffizienz [125]. Während bei Molekülen mit einzelnen Chromophoren für eine Detektionseffizienz von 95 % ein  $S/N$ -Verhältnis von  $> 50$  erforderlich ist, erfolgt beim multichromophoren Phycoerythrin bereits bei  $S/N \sim 10$  eine vollständige Detektion [125].

Im Fall der PrP-Aggregate ist das  $S/N$ -Verhältnis aufgrund der heterogenen Größe und unterschiedlichen Anzahl der Fluorophore der Aggregate nur abzuschätzen. Das  $S/N$ -Verhältnis der Korrelationsanalyse ist proportional zur Zählrate pro Molekül (cpms) [59]. In der Intensitätsanalyse lässt sich das  $S/N$ -Verhältnis als Verhältnis der mittleren Zahl der Photonen / Bin über dem Schwellenwert und der mittleren Zahl der Photonen / Bin der Intensitätsverteilung der Sondenmoleküle angeben (s. Kap. 4.2.5). Aus der Messung der *prion rods* ermittelt man damit für die Aggregate ein  $S/N$  von 15–25 bei 900 Photonen / Bin.

Das Signal der Aggregate wurde über einen konstanten Schwellenwert abgetrennt. Bei gleicher Sondenkonzentration schwankte die mittlere Intensität des Sonden Signals in verschiedenen Liquorproben um bis zu 50 %. Diese Schwankung wurde vermutlich durch Löschungseffekte verursacht. Um ein falsch-positives Signal auszuschließen, wurde ein Schwellenwert gewählt, der bei  $12 \sigma$  der mittleren Intensitätsverteilung der Sonde lag (s. Kap. 2.7). Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, ist das Signal hoher Intensität bei verschiedenen Schwellenwerten proportional zur Ag-

gregatkonzentration, solange das Signal der Sondenmoleküle vollständig abgetrennt wird. Durch das Setzen eines zu hohen Schwellenwertes geht jedoch Signal der Aggregate verloren. Durch Implementierung eines dynamischen Schwellenwertes, der die Intensitätsverteilung des Sondensignals der jeweiligen Messungen zugrundelegt, könnte die Abtrennung des Aggregatsignals verbessert werden [22].

Dies wäre auch Voraussetzung, um die Sensitivität der Detektion durch eine größere Zahl von Moleküldurchtritten zu erhöhen. Im Folgenden soll abgeschätzt werden, welche Sensitivitätssteigerung durch eine schnellere Bewegung der Probe zu erreichen ist. Bei einer Erhöhung der Scangeschwindigkeit muss gleichzeitig die Breite der Bins entsprechend verringert werden. Eine optimale Trennung von Signal und Hintergrund wird erreicht, wenn die Binweite der mittleren Durchtrittszeit eines Aggregats entspricht (vgl. Kap. 2.5.5). Das Verhältnis von mittlerem Aggregatsignal und mittlerem Sondenhintergrund bleibt in diesem Fall gleich. Im vorliegenden System ist bei einer Scangeschwindigkeit von 1 mm/s die Binweite mit 0.5 ms größer als die mittlere Fluktuationszeit der Sondenmoleküle (0.35 ms). Damit wird die Fluktuation des Signals der Sondenmoleküle durch zeitliche Mittelung verringert. Eine Verkürzung der Binweite führt daher zu einer höheren relativen Fluktuation des Sondensignal und damit zu einer Verringerung des S/N Verhältnisses. Nach Gleichung 2.27 nimmt die relative Fluktuation der Sonden bei  $V_{Fluss} = 10$  mm/s und  $T_{Bin} = 50 \mu s$  nur um den Faktor 1.5 zu. Eine prinzipielle Grenze der Scangeschwindigkeit wird dadurch erreicht, dass je Durchtritt eines Aggregates in einem Bin mindestens zwei Photonen detektiert werden müssen, um das Signal von Einphotonenprozessen, wie z.B. der Detektion eines Sondenmoleküls oder von zufälligem Detektorrauschen zu trennen. Damit ließe sich die Geschwindigkeit grundsätzlich bis auf  $\sim 100$  mm/s steigern.

### Zweikanal-SIFT

Durch die Verwendung zweier Sonden mit zwei unabhängigen Bindungssepitopen ist die Spezifität der Detektion gegenüber der Verwendung einer Sonde erhöht. Die unspezifische Bindung der Sonden führt oft zu einem Signal hoher Intensität in einem oder beiden Detektionskanälen (s. Kap. 4.2.7). Sind die unspezifischen Signale beider Sonden unabhängig voneinander, so ist die Wahrscheinlichkeit eines gleichzeitigen Signals hoher Intensität in beiden Kanälen das Produkt der Einzelwahrscheinlich-

keiten. Während einer Messung von  $1.2 \cdot 10^6$  Bins trat in maximal 50–100 Bins unspezifisches Signal auf (vgl. Abb. 4.29). Die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Signals in beiden Kanälen im Verlauf einer Messung liegt damit unter 0.01.

Die Kreuzkorrelationsanalyse differenziert inhärent zwischen einfach und zweifarbig markierten Aggregaten. Während sich Moleküle, die nur ein Fluorophor jeder Farbe tragen, bis zu einem Anteil von etwa 1 % am Gesamtsignal nachweisen lassen [109], können bereits einzelne hochmarkierte Aggregate ein hohes Kreuzkorrelationssignal erzeugen. In der Detektion pathologischer Aggregate ist die Kreuzkorrelationsamplitude über einen weiten Konzentrationsbereich proportional zum Signal der Intensitätsanalyse (s. Kap. 4.2.8). Prinzipiell ist jedoch die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion proportional zur Zahl der kreuzkorrelierenden Photonen und nicht zur Zahl der Moleküle (s. Gl. 2.31). Bei der Detektion weniger Aggregate lassen sich schwächer markierte Aggregate daher in der Intensitätsanalyse besser vom Sonden hintergrund trennen. So lieferte die Intensitätsanalyse in der liquordiagnostischen Anwendung eine bessere Trennung von positiven und negativen Proben als die Kreuzkorrelationsanalyse.

Im Gegensatz zur Kreuzkorrelationsanalyse ermöglicht die Zweikanal-Intensitätsanalyse die Charakterisierung der Signalanteile beider Sonden für jedes detektierte Aggregat. So können unterschiedliche Formen der pathologischen Prionaggregate anhand der Bindung zweier Antikörpersonden differenziert werden. Die unterschiedlichen Typen des  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  korrelieren mit verschiedenen Krankheitsverläufen. Zur biochemischen Charakterisierung dienten bislang vor allem die Größe und das Glykosylierungsmuster des proteaseresistenten Kerns des  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  [86]. Ein neueres Verfahren zur Differenzierung verschiedener Priortypen basiert auf der unterschiedlichen Bindungsaffinität von Antikörpern zur nativen und denaturierten Form des Proteins [107]. Im Gegensatz zur SIFT-basierten Charakterisierung wird die konformationspezifische Affinität des Antikörpers auf diese Weise mit einem externen Standard verglichen. Bei der Charakterisierung durch die relative Affinität zweier Antikörper erfolgt die Standardisierung dagegen intern. Der Typ des Aggregats kann damit prinzipiell unabhängig von der Aggregatgröße und Menge charakterisiert werden. Praktisch wird die statistische Aussagekraft derzeit durch die Breite der Verteilung des Bindungsverhältnisses beider Sonden begrenzt (s. Kap. 4.4). So erfordert die sichere Differenzierung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (M/M) Typ I und Typ II bei einer Überlappung

beider Verteilungen von  $\sim 20\%$  die Detektion von mindestens vier Aggregaten.

## Diagnostische Anwendung und Ausblick

Das Detektionsverfahren auf Basis eines konfokalen FCS-Aufbaus, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, ermöglicht es, mit hoher Spezifität und Sensitivität pathologische Aggregate im Liquor von Alzheimer- und CJD-Patienten nachzuweisen. Das Verfahren ist derzeit neben dem Infektionsversuch der einzige erregerspezifische Test der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung im Spinalliquor. Der Anteil der Patienten, bei denen pathologische Aggregate nachgewiesen werden konnten, lag mit 5 / 24 leicht über der Übertragungsquote im Tierversuch. Durch Inokulation von Primaten mit dem Liquor von CJD Patienten, konnte in einer Studie in 4 von 27 Fällen eine Erkrankung ausgelöst werden [15]. Die statistische Signifikanz ist aufgrund der geringen Signalmenge in den Proben und der recht kleinen Zahl untersuchter Patienten bislang begrenzt. Fortschritte in der Probenvorbereitung und die klinische Routineanwendung im Rahmen der deutschlandweiten CJD-Studie (s. Kap. 3.1.4) versprechen in der Zukunft eine breitere Datenbasis.

Grundlage für eine erfolgreiche Weiterentwicklung des Verfahrens ist die Erhöhung der Signalmenge. Zur Erreichung dieses Ziels zeigen sich mehrere parallele Entwicklungsstränge: Auf der technischen Seite des Detektionsverfahrens lässt sich die Sensitivität durch Weiterentwicklung der Algorithmen zur Abtrennung des aggregatspezifischen Signals und durch eine höhere Scangeschwindigkeit um bis zu zwei Größenordnungen steigern. Das vermutlich größte Potential zur Steigerung der Sensitivität bietet eine optimierte und standardisierte Probenabnahme und -handhabung, die im Rahmen der klinischen CJD-Studie etabliert werden soll. Das Probenmaterial kann durch einen einfachen Aufarbeitungsschritt mit Fällung der hydrophoben Aggregate [107] weiter konzentriert werden. Insbesondere bei der Alzheimerdiagnostik bildet die Kombination monomerer Sonden mit Antikörpersonden einen erfolgversprechenden Ansatz, um amyloide Aggregate gleichzeitig sensitiv und spezifisch zu detektieren.

Ein breites Gebiet zukünftiger Anwendungen bietet die gleichzeitige Detektion und Charakterisierung pathologischer Aggregate durch die differentielle Bindung mehrerer Sonden. Hier ist nicht nur eine empfindliche differentialdiagnostische An-

wendung auf die sporadische und auf die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung denkbar. Neben CJD und Morbus Alzheimer existieren weitere neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch die Bildung pathologischer Aggregate vor allem des  $\tau$ -Proteins und des  $\alpha$ -Synnucleins auszeichnen. Zu ihnen gehören unter anderem Morbus Parkinson, die Lewy Body Demenz, corticobasale Degeneration sowie Morbus Pick [46]. Durch Erweiterung auf andere Aggregate besteht damit das Potential zur Entwicklung eines Parameters, der sich zur differentiellen Diagnose einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen in einem frühen Stadium nutzen lässt.

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien oder Prionkrankheiten sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die durch ein ungewöhnliches infektiöses Agens, das Prion, übertragen werden. Nach der Prionhypothese kann eine pathologische Form des Prionproteins ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) in körpereigenem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  eine Konformationsänderung zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  induzieren. Wie auch im Falle der Alzheimerschen Erkrankung steht die Aggregation einer pathologischen Form eines körpereigenen Proteins im Zentrum der Pathogenese.

Der Aggregationsmechanismus des Prionproteins wurde anhand eines Modellsystems von rekombinanten PrP durch die Zweifarben-Kreuzkorrelations-Fluoreszenzspektroskopie (FCS) auf Einzelmolekülebene untersucht. Dabei ließen sich zwei grundlegende Mechanismen unterscheiden: a) die *de novo* Aggregation des monomeren PrP und b) die Anlagerung von Monomeren an einen Aggregationskeim. Im Rahmen der *de novo* Aggregation konnten drei Phasen der Multimerbildung differenziert werden. Erstmals konnte dabei auch der initiale Aggregationsschritt quantitativ untersucht werden. Er ließ sich durch eine irreversible Bindungsreaktion beschreiben, in der eine quantitative Bildung von (2-4)-meren erfolgte. Darauf folgte ein Wachstum der Oligomere bis  $n = 15-20$ . Im Verlauf von Stunden traten schließlich multimerere Aggregate mit  $n > 1000$  auf, deren Größe äußerst heterogen war. Der Verlauf der dritten Phase der Aggregation ist mit einem Nukleationsmechanismus vereinbar.

Auf Basis der Detektion multimerer pathologischer Aggregate des Prionproteins

bzw. der A $\beta$ -Peptide wurde ein hochempfindliches diagnostisches Verfahren für die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD) und für Morbus Alzheimer (AD) entwickelt. Durch Einsatz zweier hochaffiner fluoreszenzmarkierter Antikörpersonden ließen sich die Aggregate spezifisch mit einer großen Zahl von Fluorophoren markieren. Ein Kreuzkorrelations-FCS-Aufbau wurde durch Entwicklung einer Scan-Einrichtung sowie eines Verfahrens zur Intensitätsanalyse an die speziellen Erfordernisse der Aggregatdetektion angepasst. Durch das „Scannen intensiv fluoreszierender Target-moleküle“ (SIFT) konnte die Nachweisempfindlichkeit für pathologisches PrP<sup>Sc</sup> gegenüber etablierten Verfahren um mehr als eine Größenordnung auf 1 fM gesteigert werden.

Durch SIFT-Messung gelang der Nachweis pathologischer Aggregate im Spinalliquor von Alzheimerpatienten sowie erstmals auch im Liquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten. Verschiedene Typen des PrP<sup>Sc</sup>, die mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen korrelieren, konnten anhand der relativen Affinität der Antikörpersonden differenziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass durch effizienteres Scannen sowie durch eine optimierte Probengewinnung und -vorbereitung eine weitere Steigerung der Sensitivität um mehrere Größenordnungen möglich ist. Durch Erweiterung auf andere pathologische Aggregate besitzt das SIFT-Verfahren damit das Potential, sich zu einer Methode zu entwickeln, die nicht nur eine Diagnose von CJD und AD in einem frühen Stadium der Erkrankung erlaubt, sondern als differentialdiagnostisches Werkzeug für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden kann.



# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Alzheimersche Demenz bzw. Erkrankung
Alexa488	Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 (Handelsname eines Rhodamin-derivats)
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob Demenz bzw. Erkrankung
Cy2 / Cy5	FluoroLink <sup>TM</sup> Cyanin2 / Cyanin5
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
GPI	Glycolsyl-Phosphadityl-Inositol
h	Stunde(n)
IgG	Immunoglobulin
M	molar
min	Minute(n)
NMR	Kernspinresonanz
NP-40	nichtionisches Alkylphenyl-polyoxyethylen-Detergenz (Handelsname)
nvCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	Prionprotein
PrP <sup>C</sup>	zelluläres Prionprotein
PrP <sup>Sc</sup>	pathologische Scrapie-Isoform des Prionproteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen / Minute
rPrP	rekombinantes Prionprotein
RT	Zimmertemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
Tris	Tris-methylaminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
w/v	Anteile Gewicht von Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Literaturverzeichnis

- [1] Aguzzi A., Weissman C. (1997), *Nature* 389, 795-798.
- [2] Aragon S.R., Pecora R. (1975), Fluorescence correlation spectroscopy and brownian rotational diffusion, *Biopolymers* 14, 119-138.
- [3] Aragon S.R., Pecora R. (1976), Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics, *J. Chem. Phys.* 64, 1791-1803.
- [4] Arvinte T., Cudd A., Drake A.F. (1993), The structure and mechanism of formation of human calcitonin fibrils, *J. Biol. Chem.* 268, 6415-6422.
- [5] Barnes M.D., Whitten W.B., Ramsey J.M. (1995), Detecting Single Molecules in Liquids, *Analyt. Chem.* 367, 418A-423A.
- [6] Beyreuther B.E., Tomlinson B.E., Roth M. (1996), Alzheimer disease: genesis of Amyloid, in: The nature and origin of amyloid fibrils, *Ciba foundation symposium* 199, John Wiley & Sons, Chichester.
- [7] Bessen R.A., Kocisko D.A., Raymond G.J., Nandan S., Lansbury P.T. Jr., Caughey B. (1995), Nongenetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein, *Nature* 375, 698-700.
- [8] Bieschke J., Schwille P., Aggregation of prion protein investigated by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, in: *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes* ed. Slavik J., Vol.2, New York, 81-86.
- [9] Blessed G., Tomlinson B.E., Roth M. (1968), The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects, *Br. J. Psychiatry* 114 (512), 797-811.
- [10] Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. (1982), Identification of a protein that purifies with the scrapie prion, *Science* 218, 1309-1311
- [11] Booth D.R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C.V., Hutchinson W.L., Fraser P.E., Hawkins P.N., Dobson C.M., Radford S.E., Blake C.C., Pepys M.B. (1997), Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature* 385, 787-793.
- [12] Brinkmeyer M. (1997), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Mikrostrukturen, *Dissertation*, Braunschweig.

LITERATURVERZEICHNIS

- [13] Brown P., Gibbs C.J., Amyx H.L., Kingsbury D.T., Rohwer R.G., Sulima M.P., Gajdusek D.C. (1982), Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob-Disease virus, *N. Engl. J. Med.* 306, 1279-1282.
- [14] Brown P., Preece M.A., Will R. (1992), "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts and Creutzfeldt-Jakob disease, *Lancet* 340, 24-27.
- [15] Brown P., Gibbs C.J., Rodgers-Johnson P., Asher D.M., Sulima M.P., Bacote A., Goldfarb L.G., Gajdusek D.C. (1994), Human spongiform encephalopathy: the National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease, *Ann. Neurol.* 35, 513-529.
- [16] Bruce M.E. (1993), Scrapie strain variation and mutation, *Br. Med. Bull.* 49, 822-838.
- [17] Bruce M.E., Will R.G., Ironside J., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Berkett C. et. al. (1997), Transmissions to mice indicate that new variant" CJD is caused by the BSE-Agent, *Nature* 389, 498-501.
- [18] Büeler H., Raeber A., Sailer A., Fischer M., Aguzzi A., Weissmann C. (1993), Mice devoid of PrP are resistant to scrapie, *Cell* 73, 1339-1347.
- [19] Cantor C.R. & Schimmel P.R., *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company, New York (1980).
- [19a] Part I: *The conformation of biological macromolecules.*
- [19b] Part II: *Techniques for the study of biological structure and function.*
- [19c] Part III: *The behavior of biological macromolecules.*
- [20] Caughey B., Raymond G.J. (1991), The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive, *J. Biol. Chem.* 266, 18217-18223.
- [21] Chazot G., Broussolle E., Lapras C.L., Blettler T., Aguzzi A., Kopp N. (1996), New variant of Creutzfeldt -Jakob-Disease in a twenty-six-year-old French man, *Lancet* 347, 1181.
- [22] Chen Y., Müller J.D., Peter T.C. So., Gratton E. (1999), The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy, *Biophys. J.* 77, 553-567.
- [23] Chen Y., Müller J.D., Berland K.M., Gratton E. (1999), Fluorescence fluctuation spectroscopy, *Methods* 19, 234-252.
- [24] Cohen F.E., Prusiner S.B. (1998), Pathologic conformations of prion proteins, *Ann. Rev. Biochem.* 67, 793-819
- [25] Collinge J., Sidle K.C.L., Meads J., Ironside J., Hill A.F. (1996), Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant" CJD, *Nature* 383, 685-690.
- [26] Creutzfeldt H.G. (1920), Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems, *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 57, 1-18.

LITERATURVERZEICHNIS

- [27] Cuillé J., Chelle P.-L. (1936), La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?, *C. R. Acad. Sci.* (III) 203, 1552-1554.
- [28] Cummings B.J., Cotman C.W. (1995), Image analysis of  $\beta$ -amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity, *Lancet* 346, 1524-1528.
- [29] Ehrenberg M., Rigler R. (1974), Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations, *Chem. Phys.* 4, 390
- [30] Brinkmeier M., Dörre K., Stephan J., Eigen M. (1999), Two beam cross correlation: A method to characterize transport phenomena in micrometer-sized structures, *Anal. Chem.* 71, 609-616.
- [31] Donne D.G., Viles J.H., Groth D., Mehlhorn I., James T.L., Cohen F.E., Prusiner S.B., Wright P.E., Dyson H.J. (1997), Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29-231): The N-terminus is highly flexible, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 13452-13457.
- [32] Cohen F.E., Pan K.M., Huang Z., Baldwin M., Fletterick R.J., Prusiner S.B. (1994), Structural clues to prion replication, *Science*. 264, 530-531.
- [33] Koshlad D.E., Nemethy, G., Filmer (1969), *Biochemistry* 5, 365.
- [34] Perutz M.F. (1970), stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin, *Nature* 228, 726-739.
- [35] Eigen M. (1971), Selforganisation of matter and the evolution of biological macromolecules, *Naturwiss.* 58, 465-523.
- [36] Eigen M., Rigler R. (1994), Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 5740-5747.
- [37] Eigen M. (1996), Prionic or the kinetic basis of prion diseases, *Biophys. Chem.* 63, A1-18.
- [38] Einstein A., v. Smoluchowski M. (1997), Untersuchungen über die Theorie der Brownschen Bewegung, Abhandlung über die Brownsche Bewegung und verwandte Erscheinungen, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt.
- [39] Elson E.L., Magde D. (1974), Fluorescence correlation spectroscopy I. Conceptual basis and theory *Biopolymers* 13, 1-27.
- [40] Endo T., Groth D., Prusiner S.B., Kobata A. (1989), Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein, *Biochemistry* 28, 8380-8388.
- [41] Fraser H., Dickinson A.G. (1973), Scrapie in mice - agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation, *J. Comp. Pathol.* 83, 29-40.
- [42] Fraser H. (1993), Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals, *Br. Med. Bull.* 49, 792-809.
- [43] Gajdusek D.C., Zigas V. (1957), Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea - The endemic occurrence of "kuru" in the native population, *N. Engl. J. Med.* 257, 974-978.

# LITERATURVERZEICHNIS

- [44] Gajdusek D.C. (1977), Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru, *Science* 197, 943-960.
- [45] Glenner G.G., Wong C.W., Quaranta V., Eanes E.D. (1984), The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis, *Appl. Pathol.* 2(6), 357-369.
- [46] Goedert M. (1999), Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and  $\alpha$ -synucleinopathies, *Phil. Trans. R. Soc. B* 354, 1101-1118.
- [47] Herdegen T., Tölle T.R., Bär M. Hgs. (1997), *Klinische Neurobiologie; molekulare Pathogenese und Therapie von neurobiologischen Erkrankungen*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- [48] Hornshaw M.P., McDermott J.R., Candy J.N. (1995), Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 621-629.
- [49] Hsiao K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F. Terwilliger J.D., Westaway D., Ott J., Prusiner S.B. (1989), Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome, *Nature* 338, 342-345.
- [50] Hsiao K., Groth D., Scott M., Young S.-L., Serban H., Rapp D., Foster D., Torchia M., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1994), Serial transmissions in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9126-9130.
- [51] Jakob A. (1921), Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Enzephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden), *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 64, 147-228.
- [52] James T.L., Liu H., Ulyanov N.B., Farr-Jones S., Zhang H., Donne D.G., Kaneko K., Groth D., Mehlhorn I., Prusiner S.B., Cohen F.E. (1997), Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10086-10091.
- [53] Jarrett J.T., Lansbury P.T. Jr. (1993), Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: pathogenic mechanism in Alzheimer's Disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- [54] Lee D.H., Granja J.R., Martinez J.A., Severin K., Ghadiri M.R. (1996), A Self-replicating peptide, *Nature* 382, 525-528.
- [55] Kask P., Kaupo P., Ullmann D., Gall K. (1999), Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13756-13761.
- [56] Kettling U., Koltermann A., Schwillle P., Eigen M. (1998), Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1416-1420.
- [57] Kinjo M., Rigler R. (1995), , *Nucl. Acids Res.*, 23, 1795.

# LITERATURVERZEICHNIS

- [58] Kocisko D.A., Come J.H., Priola S.A., Chesebro B., Raymond G.J., Lansbury P.T. Jr., Caughey B. (1994), Self-reformation of protease-resistant prion protein, *Nature* 370, 471-474.
- [59] Koppel D.E. (1974), Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. A* 10, 1938-1945.
- [60] Koltermann A., Kettling U., Bieschke J., Winkler T., Eigen M. (1998), Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1421-1426.
- [61] Kascsak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fresko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringer H. (1987), Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins, *J. Virol.* 61, 3688-3693.
- [62] Krasemann S., Groschup M., Harmeyer S., Hunsmann G., Bodemer W. (1996), Generation of monoclonal antibodies against human prion protein in PrP<sup>0/0</sup> mice, *Mol. Med.* 2, 725-734.
- [63] Kragh-Hansen U., le Maire M., Moller J.V., The mechanism of detergent solubilisation of liposomes and protein-containing membranes, *Biophys. J.* 75, 2932-2946.
- [64] Kretzschmar H.A., Prusiner S.B., Stowring L.E., DeArmond S.J. (1986), Scrapie prion proteins are synthesized in neurons, *Am. J. Pathol.* 122, 1-5.
- [65] Kretzschmar H.A., Ironside J.W., DeArmond S.J., Tateishi J. (1996), Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, *Arch. Neurol.* 53, 913-920.
- [66] Harper J.D., Lansbury P.T. Jr. (1997), Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Ann. Rev. Biochem.* 66, 385-407.
- [67] Harlow D., Lane D. (1988), *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor.
- [68] Lasmézas C.L., Deslys J.-P., Demalmay R., Adjou K.T., Lamoury F., Dormont D., Robain O., Ironside J., Hauw J.-J. (1996), BSE-transmission to macaques, *Nature* 381, 743-744.
- [69] Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P., Zucconi M., Gambetti P. (1986), Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei, *N. Engl. J. Med.* 315, 997-1003.
- [70] Magde D., Elson E.L., Webb W.W. (1972), Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.* 29, 705-711.
- [71] Magde D., Elson E.L., Webb W.W. (1974), Fluorescence correlation spectroscopy II. An experimental realization, *Biopolymers* 13, 29-61.

LITERATURVERZEICHNIS

- [72] Magde D., Webb W.W., Elson E.L. (1978), Fluorescence correlation spectroscopy III. Uniform translation and laminar flow, *Biopolymers* 17, 361-376.
- [73] Maiti S., Haupts U., Webb W.W. (1997), Fluorescence correlation spectroscopy: Diagnostics for sparse molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11753-11757.
- [74] Masel J., Jansen V.A.A., Nowak M.A. (1999), Quantifying the kinetic parameters of prion replication, *Biophys. Chem.* 77, 139-152.
- [75] Mehlhorn I., Groth D., Stockel J., Moffat B., Reilly D., Yansura D., Willett W.S., Baldwin M., Fletterick R., Cohen F.E., Vandlen R., Henner D., Prusiner S.B. (1996), High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein, *Biochemistry* 35, 5528.
- [76] Meseth U., Wohland Th., Rigler R. (1999), Resolution of fluorescence correlation measurements, *Biophys. J.* 76, 1619-1631.
- [77] Meyer T., Schindler H. (1988), Particle counting by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 54, 983-993.
- [78] Moore R.C., Hope J., McBride P.A., McConnell I., Selfridge J., Melton D.W., Manson J.C. (1998), Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent, *Nat. Genet.* 18, 118-125.
- [79] Molecular Probes, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1995-98 Eugene, Oregon.
- [80] Müller W.E.G., Ushijima H., Schröder H.C., Forrest, J.M., Schatton W.F., Rytik P.G., Heffner-Laue M. (1993), Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrP<sup>Sc</sup>)-induced toxicity in rat cortical cells cultures, *Eur. J. Pharmacol.* 246, 261-267.
- [81] Oehlenschläger F., Schwille P., Eigen M. (1996), Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12811-12816.
- [82] Palmer A.G., Thompson N.L. (1987), Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 52, 257-270.
- [83] Palmer A.G., Thompson N.L. (1989), High-order fluorescence fluctuation analysis of model protein clusters *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6148-6152.
- [84] Palmer A.G., Thompson N.L. (1989), Fluorescence correlation spectroscopy for detecting submicroscopic clusters of fluorescent molecules in membranes *Chem. Phys. Lipids* 50, 253-270.
- [85] Pan K.-M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E. et al. (1993), Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10962-10966.
- [86] Parchi P., Capellari S., Chen S.G., Petersen R.B., Gambetti P., Kopp N., Brown P., Kitamoto T., Tateishi J., Giese A. et al. (1997), Typing prion isoforms, *Nature* 386, 232-234.



LITERATURVERZEICHNIS

- [87] Petersen N.O. (1984), Diffusion and aggregation in biological membranes, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 1158-1166.
- [88] Petersen N.O., Johnson D.C., Schlesinger M.J. (1986), Scanning fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 49, 817-820.
- [89] St.-Pierre P.R., Petersen N.O. (1992), Average size and density of microclusters of epidermal growth factor receptors on A431 cells, *Biochemistry* 31, 2459-2463.
- [90] Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.J., Cotman C.W. (1993), Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of the assembly state, *J. Neurosci.* 13 (4), 1676-1687.
- [91] Pitschke M. (1999), Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnoseverfahrens von spongiformen Enzephalopathien und der Alzheimerschen Erkrankung, *Dissertation*, Düsseldorf.
- [92] Pitschke M., Prior R., Haupt M., Riesner D. (1998), Detection of single amyloid  $\beta$ -protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy, *Nature Medicine* 4, 832-834.
- [93] Post K., Pitschke M., Schäfer O., Wille H., Appel T.R., Kirsch D., Mehlhorn I., Serban H., Prusiner S.B., Riesner D. (1998), Rapid acquisition of  $\beta$ -sheet structure in the prion protein prior to multimer formation, *Biol. Chem.* 379, 1307-1317.
- [94] Prusiner S.B., Hadlow W.J., Garfin D.E., Cochran S.P., Baringer J.R., Race R.E., Eklund C.M. (1978), Partial purification and evidence for multiple molecular forms of the scrapie agent, *Biochem.* 17, 4993-4999.
- [95] Prusiner S.B. (1982), Novel proteinacious infectious particles cause scrapie, *Science* 216, 136-144.
- [96] Prusiner S.B., McKinley M.P., Bowman K.A., Bolton D.C., Bendheim P.E., Groth D.F., Glenner G.G. (1983), Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods, *Cell* 35, 349-358.
- [97] Prusiner S.B. (1991), Molecular biology of prion diseases *Science* 252, 1515-1522.
- [98] Prusiner S.B. (1998), The prion diseases, *Brain Pathol.* 8, 499-513.
- [99] Qian H., Elson E.L. (1990), Distribution of molecular aggregation by analysis of fluctuation moments *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5479-5483.
- [100] Qian H. (1990), On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. Chem.* 38, 49-57.
- [101] Reynolds J.A., Herbert S., Polet H., Steinhardt J. (1967), The binding of divers detergent anions to bovine serum albumine, *Biochemistry* 6, 937-947
- [102] Riesner D., Kellings K., Wiese U., Wulfert M., Mirenda C., Prusiner S.B. (1993), Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene, *Dev. Biol. Stand.* 80, 173-181.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [103] Rieck R., Hornemann S., Wider G., Glockshuber R., Wüthrich K. (1997), NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231), *FEBS Lett.* 413, 282-288.
- [104] Rigler R., Widengren J. (1990), Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy, in *BioScience* Eds. Klinge B. and Owman C., S. 180.
- [105] Rigler R., Mets Ü (1992), Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam, *SPIE* 1921, 239-248.
- [106] Rigler R., Mets Ü., Widengren J., Kask P. (1993), Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion, *Eur. Biophys. J.* 22, 169-175.
- [107] Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1998), Eight prion strains have PrP<sup>Sc</sup> molecules with different conformations, *Nature Medicine* 4, 1157-1165.
- [108] Sauer M., Han K.T., Müller R., Schulz A., Tadday R., Seeger S., Wolfrum J. (1995), New fluorescent dyes in the red region for biodiagnostics, *J. Fluor.* 5(3), 247.
- [109] Schwille P. (1997), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene, *Dissertation*, Braunschweig
- [110] Schwille P., Oehlenschläger F., Walter N. (1996), Quantitative hybridisation kinetics of DNA probes to RNA in solution followed by fluorescence correlation analysis, *Biochemistry* 35, 10182-10193.
- [111] Schwille P., Meyer-Almes F.-J., Rigler R. (1997), Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophys. J.* 72, 1878-1886.
- [112] Schwille P., Bieschke J., Oehlenschläger F. (1997), Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophys. Chem.* 66, 211-228.
- [113] Schwille P., Haupts U., Maiti S., Webb W.W. (1999), Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation, *Biophys. J.* 77, 2251-2265.
- [114] v. Smoluchowski M. (1914), *Wien. Ber.* 123, 2381-2405.
- [115] Stöckel J., Safar J., Wallace A.C., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1998), Prion protein selectively binds copper (II) ions, *Biochemistry* 37, 7185-7193.
- [116] Svedberg T., Inouye K. (1911) *Z. Phys. Chem.* 77, 145-191.
- [117] Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1995), Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, *Cell* 83, 79-90.

LITERATURVERZEICHNIS

- [118] Terzi E., Hölzemann G., Seelig J. (1994), Reversible random coil  $\beta$ -sheet transition of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid fragment (25-35), *Biochemistry* 33, 1345-1350.
- [119] Terzi E., Hölzemann G., Seelig J. (1995), Self-association of  $\beta$ -amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes, *J. Mol. Biol.* 252, 633-642.
- [120] Tanford C. (1972), Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphiles, *J. Mol. Biol.* 67, 59-74.
- [121] Thompson N.L. (1991), Fluorescence correlation spectroscopy, in: *Topics in fluorescence spectroscopy*, ed. Lakowicz J.R., Vol. 1, Plenum Press, New York, S. 337.
- [122] Weissmann C. (1991), Spongiform encephalopathies. The prions progress, *Nature* 349, 569-571.
- [123] Weissmann C. (1991), A unified theory of prion propagation, *Nature* 352, 679-83.
- [124] Weissmann C. (1994), Molecular biology of prion diseases, *Trends Cell Biol.* 4, 10-14.
- [125] Whitten W.B., Ramsey J.M. (1992), *J. Appl. Spectrosc.* 46, 1587
- [126] World Health Organisation, Human spongiform encephalopathies, *Weekly epidemiological record* 1998 73;47 361-265.
- [127] Widengren J., Rigler R., Mets Ü. (1994), Triplet state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Fluor.* 4, 255.
- [128] Winkler T., Kettling U., Koltermann A., Eigen M. (1999), Confocal fluorescent coincidence analysis: An approach to high throughput screening, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96, 1375-1378.
- [129] Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith P.G. (1996), A new variant of Creutzfeldt-Jakob-disease in the UK, *Lancet* 347, 921-925.
- [130] Wille H., Zhang G.-F., Baldwin M.A., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1996), Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers, *J. Mol. Biol.* 259, 608-621.
- [131] Wood S.J., Wetzel R., Martin J.D., Hurle M.R. (1995), Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide  $\beta$ /A4, *Biochemistry* 34, 724-730.
- [132] Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S.J., Smart E.J., Anderson R.G., Taraboulos A., Prusiner S.B. (1996), Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membraneous domains, *Proc. Natl. Sci. USA* 93, 14945-14949.
- [133] Zerr I., Bodemer M., Racker S., Grosche S., Poser S., Kretschmar H.A., Weber T. (1995), Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease., *Lancet* 345, 1609-1610.

*LITERATURVERZEICHNIS*

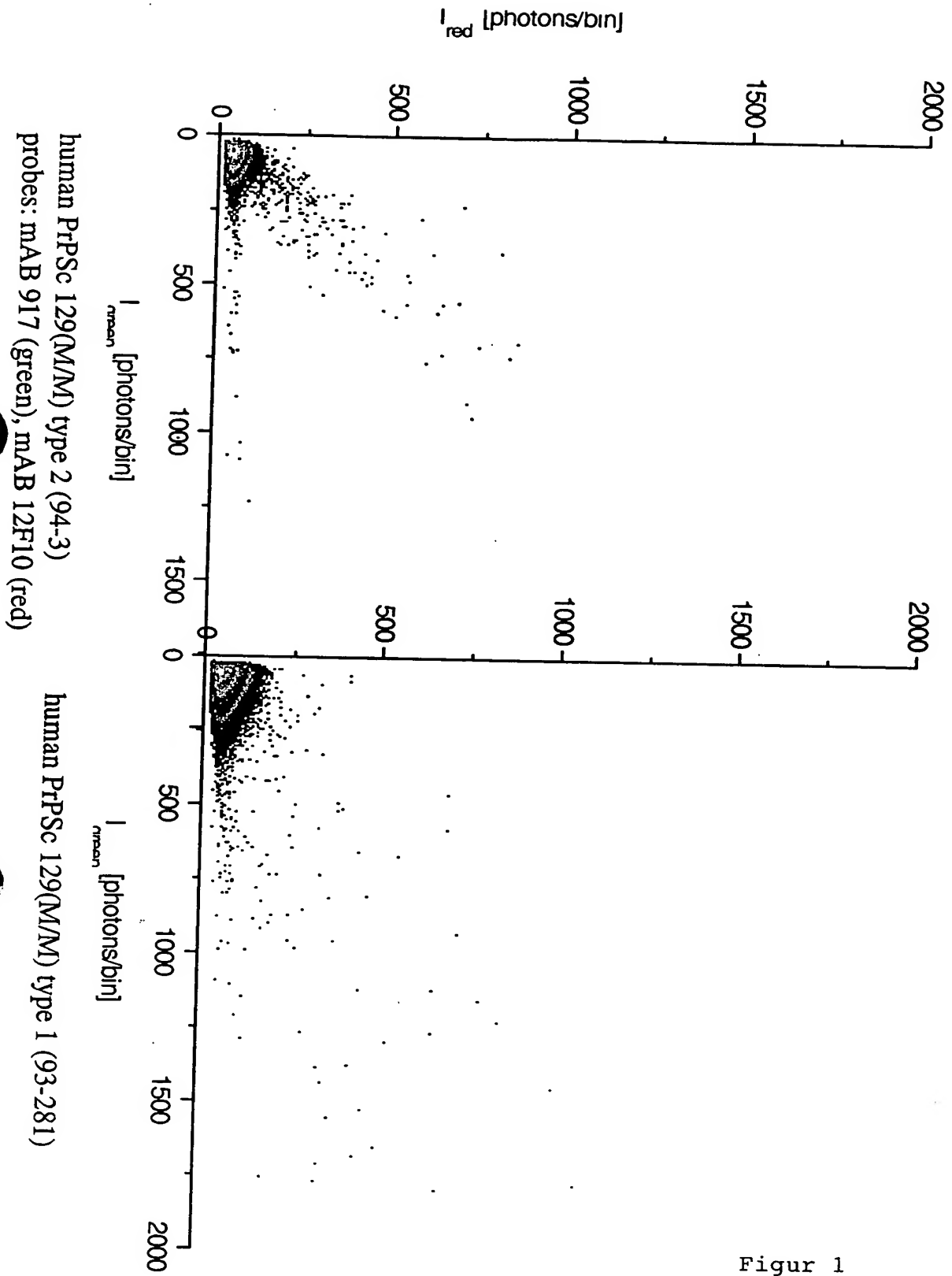
- [134] Zerr I., Bodemer M., Gefeller O., Otto M., Poser S., Wiltfang J., Windl O., Kretzschmar H.A., Weber T. (1998), Detection of 14-3-3 Protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease, *Ann. Neurol.* 43, 32-40.

### Patentansprüche

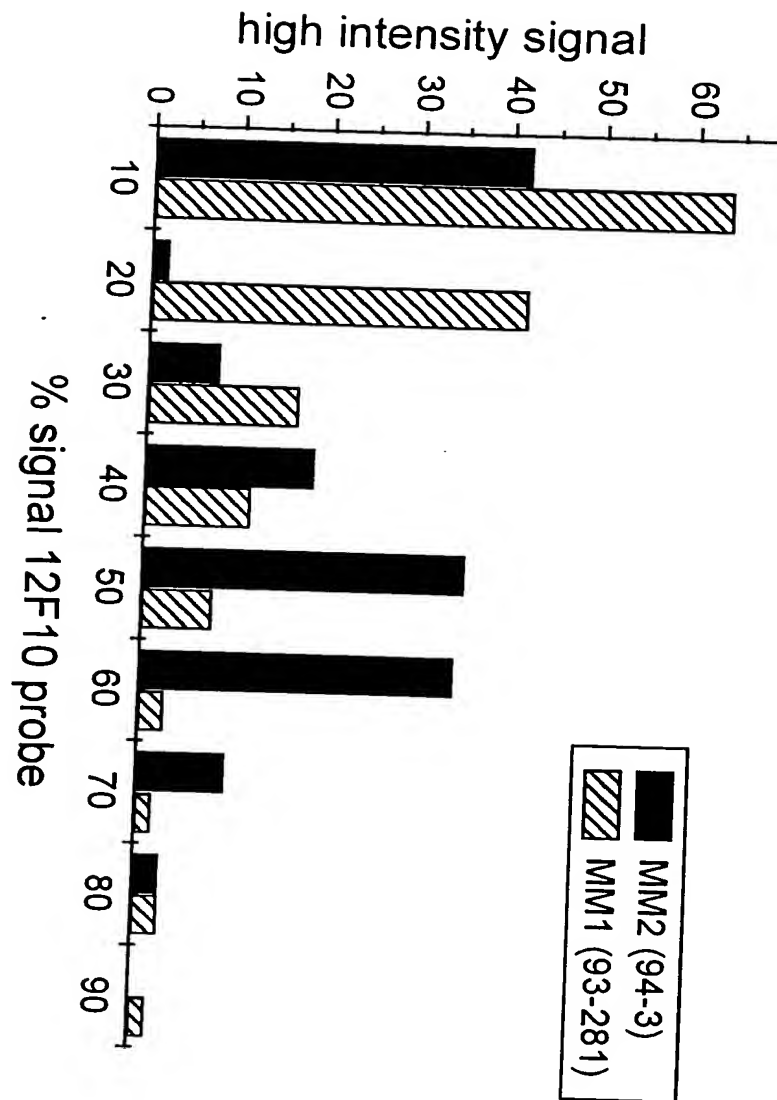
1. Verfahren zur Charakterisierung pathologischer Proteinablagerungen, insbesondere Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Proteinablagerungen bildenden Proteine oder Aggregate, insbesondere Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.
2. Verfahren zur Bestimmung und individuellen Charakterisierung von Partikeln mittels zweier unterschiedlicher detektierbarer Sonden in einer Probe, wobei
  - die Partikel einzelne Moleküle oder Molekülaggregate sind mit einer Vielzahl von Bindungsstellen für mindesten eine der mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden,
  - die mindestens zwei unterschiedlichen detektierbaren Sonden in der Probe anwesend sind,
  - ein Maß für die Anzahl der gebundenen Sonden und
  - das Verhältnis der gebundenen Sonden zueinander durch Bestimmung von Partikeln ermittelt wird
  - und wobei die Bestimmung auf Basis von einzelnen Partikeln erfolgt.

### Zusammenfassung

Verfahren zur Charakterisierung pathologischer Proteinablagerungen, insbesondere Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Proteinablagerungen bildenden Proteine oder Aggregate, insbesondere Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.



Figur 1



Figur 2